

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 7 月 10 日 (10.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/056024 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 7/22
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/13766
(22) 国際出願日: 2002 年 12 月 27 日 (27.12.2002)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 2001-398545
2001 年 12 月 27 日 (27.12.2001) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番 4 号
Osaka (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 矢島 麗嘉
(YAJIMA, Kazuyoshi) [JP/JP]; 〒673-0005 兵庫県 明石市 小久保 1 2 0-5 5-A 8 0 4 Hyogo (JP). 加藤
隆久 (KATO, Takahisa) [JP/JP]; 〒673-0005 兵庫県 明石市 小久保 5 1-2-2 0 5 Hyogo (JP). 神田 彰久
(KANDA, Akihisa) [JP/JP]; 〒545-0051 大阪府 大阪市 阿倍野区旭町 3 丁目 3-7-9 0 8 Osaka (JP). 北村
志郎 (KITAMURA, Shiro) [JP/JP]; 〒673-0882 兵庫県 明石市 相生町 1 丁目 1 0-3 6-6 0 1 Hyogo (JP).
上田 恭義 (UEDA, Yasuyoshi) [JP/JP]; 〒671-1227 兵庫県 姫路市 網干区和久 1 4 0-1 5 Hyogo (JP).
(74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番
2 0 号 中央ビル Osaka (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: PROCESSES FOR PRODUCING COENZYME Q₁₀(54) 発明の名称: 補酵素 Q₁₀ の製造方法

(57) Abstract: A process for producing reduced coenzyme Q₁₀ which comprises obtaining microbial cells containing reduced coenzyme Q₁₀ in an amount of at least 70 % by mol based on the total coenzymes Q₁₀, disrupting the cells if needed, and then collecting the reduced coenzyme Q₁₀ thus produced. A process for producing oxidized coenzyme Q₁₀ which comprises oxidizing the microbial cells or the suspension of the disrupted cells as described above and then collecting the oxidized coenzyme Q₁₀ thus formed, or collecting the reduced coenzyme Q₁₀ from the microbial cells or the suspension of the disrupted cells as described above and then oxidizing the same. According to these processes, reduced coenzyme Q₁₀ and oxidized coenzyme Q₁₀ can be conveniently produced on an industrial scale.

(57) 要約:

本発明は、還元型補酵素 Q₁₀ を全補酵素 Q₁₀ のうち 70 モル % 以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて前記細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q₁₀ を回収する還元型補酵素 Q₁₀ の製造方法である。また、前記微生物細胞又は該細胞破碎液を酸化した後、生成した酸化型補酵素 Q₁₀ を回収するか、或いは、前記微生物細胞又は該細胞破碎液から還元型補酵素 Q₁₀ を回収した後、酸化処理に付す、酸化型補酵素 Q₁₀ の製造方法である。本発明の方法により、還元型補酵素 Q₁₀、及び、酸化型補酵素 Q₁₀ を工業的規模で簡便に製造できる。

WO 03/056024 A1



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

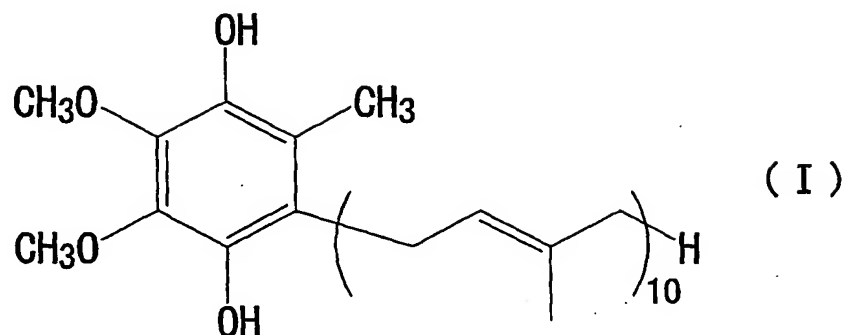
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

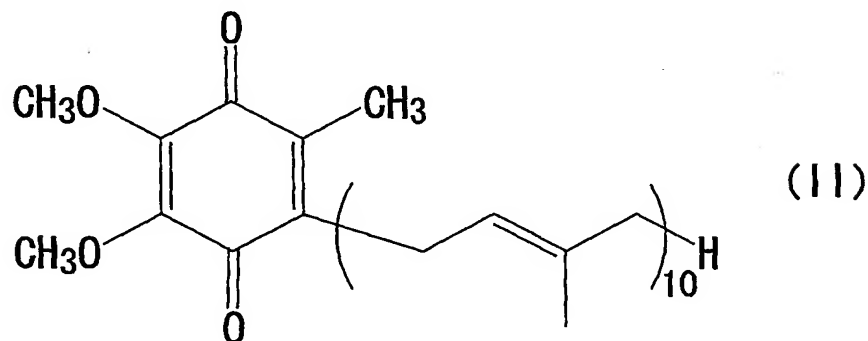
補酵素 Q_{10} の製造方法

技術分野

5 本発明は、下記式 (I) ;



10 で表される還元型補酵素 Q_{10} 、及び、下記式 (II) ;



15 20 で表される酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法に関する。

さらに詳しくは、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち 70 モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を回収する、還元型補酵素 Q_{10} の製造方法に関する。

25 また、前記微生物細胞又は該細胞破碎物を酸化処理に付した後に酸化型補酵素 Q_{10} を回収するか、或いは、前記微生物細胞又は該細胞破碎物から還元型補酵素 Q_{10} を回収した後に酸化処理に付す、酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法にも関する。

背景技術

還元型補酵素 Q_{10} (I) 及び酸化型補酵素 Q_{10} (II) は、人の生体内の細胞中におけるミトコンドリアの電子伝達系構成因子であり、酸化的リン酸化反応における電子の運搬子として働くことによりATPの生成に関与している。

- 5 従来から、酸化型補酵素 Q_{10} は、各種疾病に対して優れた薬理及び生理効果を示す物質として医薬品以外にも栄養補助食品や化粧品に使用される等、幅広い用途で用いられている。

- 一方、還元型補酵素 Q_{10} は、これまであまり注目されていなかったが、近年、種々の用途において酸化型補酵素 Q_{10} よりも有効であるとの報告がなされるよう
10 うになってきた。

- 例えば、特開平10-330251号公報には、還元型補酵素 Q_{10} を有効成分とする、優れたコレステロール低下作用を有する抗高コレステロール血症剤、抗高脂血症剤ひいては動脈硬化症治療及び予防剤が開示されている。また、特開
15 平10-109933号公報には、還元型補酵素 Q_{10} を含有する補酵素 Q_{10} を有効成分とする、経口吸収性に優れた医薬品組成物が開示されている。

- さらに、還元型補酵素 Q_{10} は抗酸化剤、ラジカルスカベンジャーとしても有効であり、アール・ストッカー (R.Stocker) らは、還元型補酵素 Q_{10} がヒトLDLの過酸化を α -トコフェロール、リコペンや β -カロチンより効率的に防止したことを報告している (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America)、88巻、1646-1650頁、1991年)。
20 ミー オブ サイエンス オブ ザ ユナイテッド ステーツ オブ アメリカ

- 生体内で、酸化型補酵素 Q_{10} と還元型補酵素 Q_{10} はある種の平衡関係にあり生体内に吸収された酸化型補酵素 Q_{10} /還元型補酵素 Q_{10} は相互に還元/酸化
25 されることが知られている。

還元型補酵素 Q_{10} の製法としては、酸化型補酵素 Q_{10} の製法と同様、化学合成法が考えられるが、その合成プロセスは煩雑・危険で、コスト高と予想される。また、化学合成法の場合は、安全性が懸念される (Z) -異性体の副生・混入 (バイオメディカル アンド クリニカル アスペクト オブ コエンザイムQ (

Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q) 、3巻、19項-30項、1981) を最小化する必要もあるであろう。酸化型補酵素 Q_{10} は、ヨーロッパ局方においては、(Z)-異性体の含有量が0.1%以下でなければならないと規定されている。

5 還元型補酵素 Q_{10} の別の製法として、微生物細胞を利用する方法、すなわち、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物から還元型補酵素 Q_{10} を分離・回収する方法も考えられるが、上記微生物細胞により生産される還元型補酵素 Q_{10} は多くの酸化型補酵素 Q_{10} を含んでおり、既知の方法を用いる還元型補酵素 Q_{10} の分離・回収はコスト高である。

10 微生物細胞中に還元型補酵素 Q_{10} が存在することを記載したものとしては、例えば、以下の細菌の例が知られている。

1) 光合成細菌の培養菌体において、還元型補酵素 Q_{10} が全補酵素 Q_{10} のうち、少ない場合で5~10重量%、多い場合で30~60重量%存在すると記載した例(特開昭57-70834号公報)。

15 2) シュードモナス属菌体を、水酸化ナトリウム及びピロガロールの存在下に、有機溶剤で加熱抽出した後、5%ヒドロサルファイトソーダ水で処理し、さらに脱水濃縮してアセトン可溶部を採取することにより、還元型補酵素 Q_{10} を含む油状物を取得した例(特開昭60-75294号公報)。

上記1)及び2)はいずれも、得られた還元型補酵素 Q_{10} と酸化型補酵素 Q_{10} の混合物、或いは、還元型補酵素 Q_{10} を、さらに酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換することを目的としたものであり、還元型補酵素 Q_{10} は酸化型補酵素 Q_{10} 製造における中間物質として記載されているにすぎない。

上記1)は、光合成細菌を用いており、培養が煩雑であるうえ、上記微生物細胞においては、還元型補酵素 Q_{10} の製造を目的とした場合、全補酵素 Q_{10} 中の還元型補酵素 Q_{10} の比率は十分とは言えない。

上記2)は、ヘキサン相中に含まれる酸化型補酵素 Q_{10} を還元剤であるヒドロサルファイトソーダで還元型補酵素 Q_{10} に変換する操作(特開昭60-75294号公報の実施例3を参照)を含んでおり、微生物細胞中の、全補酵素 Q_{10} 中の還元型補酵素 Q_{10} の比率は明らかでない。

また、上記 1) 及び 2) においては、培養における補酵素 Q の生産量は記載されていない。

以上のように、還元型補酵素 Q_{10} を高い比率で含有する微生物細胞はこれまで報告されておらず、ましてや還元型補酵素 Q_{10} を工業的規模で発酵生産、即ち、微生物を培養して還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} 中高い比率で含有する微生物細胞を得、還元型補酵素 Q_{10} を回収することにより、高純度の還元型補酵素 Q_{10} を得た例も知られていない。

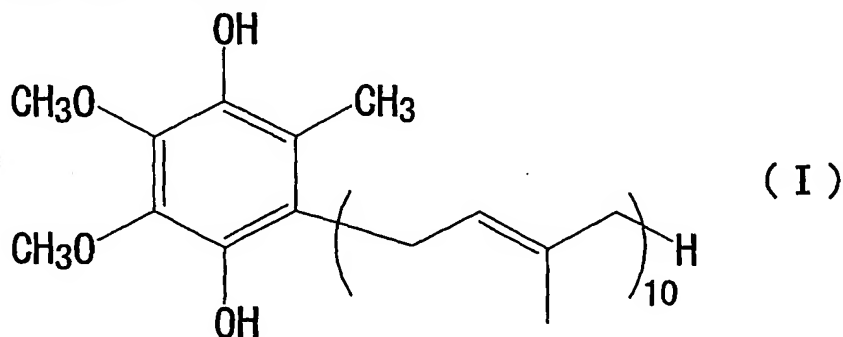
このような状況において、微生物を培養して、還元型補酵素 Q_{10} 比率の高い補酵素 Q_{10} を多量に得る方法を見いだせば、還元型補酵素 Q_{10} の極めて有利な製造法となりうる。

発明の要約

本発明の目的は、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養し、還元型補酵素 Q_{10} を高い比率で含有する微生物細胞を得、該微生物細胞から還元型補酵素 Q_{10} を好適に回収することにより、還元型補酵素 Q_{10} を安全且つ効率的に工業的規模で生産する方法を提供することにある。

また、本発明の目的は、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養し、還元型補酵素 Q_{10} を高い比率で含有する微生物細胞を得、該微生物細胞から得られた還元型補酵素 Q_{10} を、酸化型補酵素 Q_{10} 製造における中間物質として、これを酸化することにより、簡便な操作で酸化型補酵素 Q_{10} を製造する方法を提供することにもある。

即ち、本発明は、下記式 (I) ;

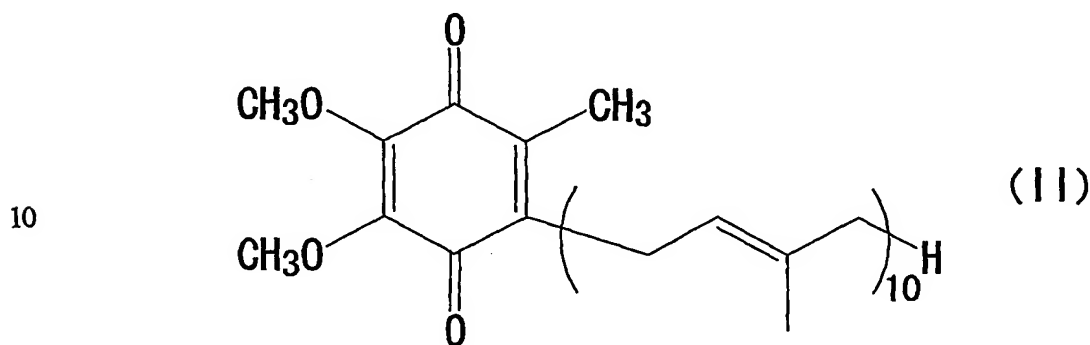


で表される還元型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及

び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出することを特徴とする還元型補酵素 Q_{10} の

5 製造方法である。

また、本発明は、下記式 (II) ；



で表される酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換した後にこれを有機溶剤で抽出するか、或いは、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出し、必要により精製処理を施した後に、還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換することを特徴とする酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法でもある。

本発明の方法によれば、微生物の培養、還元型補酵素 Q_{10} の回収という非常に簡便な操作によって、還元型補酵素 Q_{10} を工業的規模で安価に製造することができる。また、酸化型補酵素 Q_{10} についても、簡便な操作によって製造することができる。さらに、微生物によって生産されるこれらの補酵素 Q_{10} は、基本的に (Z) -異性体を含まず、肉、魚等に含まれるものと同じ (all-E) -異性体を得ることができる。

発明の詳細な開示

本発明では、まず、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養し、還元型補酵素

Q₁₀を全補酵素Q₁₀のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得る（発酵）。

全補酵素Q₁₀中、上記のような高い比率で還元型補酵素Q₁₀を含有する微生物細胞は、基本的に、還元型補酵素Q₁₀を全補酵素Q₁₀のうち70モル%以上、
5 好ましくは75モル%以上の比率で生成しうる微生物を培養することにより得られる。

微生物が、全補酵素Q₁₀のうち、いかなる比率で還元型補酵素Q₁₀を生成しうるかは、例えば、試験管（内径21mm、全長200mm）を用いて、微生物を10mLの培地〔（グルコース20g、ペプトン5g、酵母エキス3g、マル
10 トエキス3g）／L、pH6.0〕中で25℃、72時間振とう培養（振幅2cm、310往復／分）する方法により評価することができる。

工業的規模での発酵生産における好ましい培養条件については後述するが、上記の培養条件は、微生物がその能力として有する還元型補酵素Q₁₀比率を大きく誤りのない範囲で反映するように標準化するための一つの方法である。

15 上記の培養条件下、還元型補酵素Q₁₀が全補酵素Q₁₀のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の含量を示す微生物細胞を本発明に用いるのが良い。尚、さらに好ましくは、上記の培養条件下、培地当たりの還元型補酵素Q₁₀の生産能力として、通常1μg/mL以上、好ましくは2μg/mL以上の生産能力を有する微生物を用いるのが良い。

20 ここで、上記の還元型補酵素Q₁₀含有量、及び、全補酵素Q₁₀中の還元型補酵素Q₁₀比率は、微生物細胞を物理的に破碎した後、有機溶媒で抽出してHPLC分析を行うことにより確認できる。具体的には、以下の手順により測定される。

1) 微生物増殖液を必要に応じて濃縮し、当該増殖液10容量部をネジ口試験管
25 （内径16.5mm、全長130mm）に移し、ガラスビーズ（425～600ミクロン；SIGMA社製）10容量部を加える。

2) 窒素雰囲気下、該増殖液10容量部に対してイソプロパノール3容量部及びn-ヘキサン18.5容量部を加える。

3) 窒素雰囲気下、3分間激しく振とうすることにより、微生物細胞の破碎及び

抽出を行う。

4) 得られた疎水性有機溶剤相 (n-ヘキサン相) を減圧下にエバポレート (バ
ス温: 40℃) し、HPLCにより分析する。

カラム: YMC-Pack 4. 6×250mm (YMC. Co., Ltd.

5 製)

移動相: メタノール/n-ヘキサン=85/15

流速: 1mL/min

検出: UV 275nm

保持時間: 還元型補酵素Q₁₀ 13.5min

10 酸化型補酵素Q₁₀ 22.0min

上記測定方法は、得られた結果が還元型補酵素Q₁₀含有量及び全補酵素Q₁₀
中の還元型補酵素Q₁₀比率を極力正しく反映するように、且つ、最低限保証し
うる還元型補酵素Q₁₀含有量及び比率を標準化するために与えられる。この方
法は、本発明者らの幾つかの実験により、実施するのが容易且つ適切な方法であ
15 ることが見出されたものである。

本発明で用いる上記還元型補酵素Q₁₀生産性微生物としては、細菌、酵母、
カビのいずれも制限無く使用することができる。上記微生物としては、具体的
には、例えば、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、アスペルギルス (Asperg
illus) 属、アセトバクター (Acetobacter) 属、アミノバクター (Aminobacter) 属、
20 アグロモナス (Agromonas) 属、アシドフィラス (Acidiphilium) 属、ブレロミ
セス (Bulleromyces) 属、ブレラ (Bullera) 属、ブレブンジモナス (Brevundimo
nas) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、キオノスファエラ (Chionospha
era) 属、カンジタ (Candida) 属、セリノステルス (Cerinosterus) 属、エキソフ
ィアラ (Exisophiala) 属、エキソバシジウム (Exobasidium) 属、フィロミセス
25 (Fellomyces) 属、フィロバシジエラ (Filobasidiella) 属、フィロバシジウム (Fi
lobasidium) 属、ゲオトリカム (Geotrichum) 属、グラフィオラ (Graphiola) 属、
グルコノバクター (Gluconobacter) 属、コッコバエラ (Kockovaella) 属、クルツ
マノミセス (Kurtzmanomyces) 属、ララリア (Lalaria) 属、ロイコスポリジウム
(Leucosporidium) 属、レギオネラ (Legionella) 属、メチロバクテリウム (Meth

yllobacterium) 属、ミコプラナ (Mycoplana) 属、オースポリジウム (Oosporidium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、シュドジマ (Psedozyma) 属、パラコッカス (Paracoccus) 属、ペトロミセス (Petromyc) 属、ロドトルラ (Rhodotula) 属、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属、リゾモナス (Rhizomonas) 属、ロドビウム (Rhodobium) 属、ロドプラネス (Rhodoplanes) 属、ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、スポロボロミセス (Sporobolomyces) 属、スポリジオボラス (Sporidiobolus) 属、サイトエラ (Saitoella) 属、シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 属、スフィンゴモナス (Sphingomonas) 属、スポトリクム (Sporotrichum) 属、シンポジオミコプシス (Sympodiomyopsis) 属、ステリグマトスポリジウム (Sterigmatosporidium) 属、タファリナ (Tapharina) 属、トレメラ (Tremella) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、チレチアリア (Tilletiaria) 属、チレチア (Tilletia) 属、トリポスポリウム (Tolyposporium) 属、チレチオプシス (Tilletiopsis) 属、ウスチラゴ (Ustilago) 属、ウデニオミセス (Udeniomyce) 属、キサントフィロミセス (Xanthophyllomyces) 属、キサントバクテリウム (Xanthobacter) 属、ペキロマイセス (Paecilomyces) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属、ハイホモナス (Hyhomonus) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属等の微生物を挙げることができる。

培養の容易さや生産性の観点からは、細菌（好ましくは非光合成細菌）及び酵母が好ましく、例えば、細菌ではアグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属等が、酵母ではシゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 属、サイトエラ (Saitoella) 属等が挙げられる。

好ましい種としては、例えば、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス (Agrobacterium tumefaciens IFO13263)、アグロバクテリウム・ラジオバクター (Agrobacterium radiobacter ATCC4718)、アスペルギルス・クラバータス (Aspergillus clavatus JCM1718)、アセトバクター・キシリヌム (Acetobacter xylinum IFO15237)、アミノバクター・アガノウエンシス (Aminobacter aganouensis JCM7854)、アグロモナス・オリゴトロフィカ (Agromonas oligotrophica JCM1494)、アシドフィラス・ムルチボラム (Acidiphilium multivorum JCM8867)、ブレロミセス・アルバス (Bulleromyces albus IFO1192)、ブレラ・アルメニカ (

- Bullera armeniaca IFO10112)、ブレブンジモナス・ジミヌタ (*Brevundimonas diminuta* JCM2788)、クリプトコッカス・ラウレンティー (*Cryptococcus laurentii* IFO0609)、キオノスファエラ・アポバシジアリス (*Chionosphaera apobasidialis* CBS7430)、カンジタ・クルバータ (*Candida curvata* ATCC10567)、セリノ
- 5 ステルス・ルテオアルバス (*Cerinosterus luteoalbus* JCM2923)、エキソフィアラ・アルカロフィラ (*Exisophiala alcalophila* JCM12519)、エキソバシジウム・グラシル (*Exobasidium gracile* IFO7788)、フィロミセス・フゾエンシス (*Fellomyces fuzhouensis* IFO10374)、フィロバシジエラ・ネオフォルマス (*Filobasidella neoformans* CBS132)、フィロバシジウム・カプスロイゲヌム (*Filobasidium capsuloigenum* CBS1906)、ゲオトリカム・カピタウム (*Geotrichum capitatum* JCM6258)、グラフィオラ・シリンドリカム (*Graphiola cylindrica* IFO6426)、グルコノバクター・スボキシダンス (*Gluconobacter suboxydans* IFO3257)、
- 10 コッコバエラ・イムペラタエ (*Kockovaella imperatae* JCM7826)、クルツマノミセス・ネクタイレイ (*Kurtzmanomyces nectairei* IFO10118)、ララリア・セラシ (*Lalaria cerasi* CBS275.28)、ロイコスפורジウム・スコティー (*Leucosporidium scottii* IFO1212)、レギオネラ・アニーサ (*Legionella anisa* JCM7573)、メチロバクテリウム・エキトルグエンス (*Methylobacterium extorquens* JCM2802)、ミコプラナ・ラモーサ (*Mycoplasma ramosa* JCM7822)、オースפורジウム・マルガリチフェルム (*Oosporidium margaritifera* CBS2531)、シュードモナス・デニトリフィカンス (*Pseudomonas denitrificans* IAM 12023)、シュードモナス・シルキリエンシス (*Pseudomonas shuykilliensis* IAM 1092)、シュドジマ・アフィジス (*Pseudozyma aphidis* CBS517.23)、パラコッカス・デニトリフィカンス (*Paracoccus denitrificans* JCM6892)、ペトロミセス・アリアセウス (*Petromyces alliaceus* IFO7538)、ロドトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis* IFO1125)、ロドトルラ・ミヌタ (*Rhodotorula minuta* IFO0387)、ロドスפורジウム・ジオボバツム (*Rhodosporidium diobovatum* ATCC1830)、リゾモナス・スベリファシエンス (*Rhizomonas suberifaciens* IFO15212)、ロドビウム・オリエンツ (*Rhodobium orientis* JCM9337)、ロドプラネス・エレガンス (*Rhodoplanes elegans* JCM9224)、ロドシュードモナス・パルトリス (*Rhodopseudomo*

- nas palustris JCM2524)、ロドバクター・カプスレータス (*Rhodobacter capsulatus* SB1003)、スポロボロミセス・ホルサティカス (*Sporobolomyces holsaticus* IFO1034)、スポロボロミセス・パラロセウス (*Sporobolomyces pararoseus* IFO0471)、スポリジオボラス・ジョンソニー (*Sporidiobolus johnsonii* IFO1840)、
- 5 サイトエラ・コンプリカタ (*Saitoella complicata* IFO10748)、シゾサッカロミセス・ポンペ (*Schizosaccharomyces pombe* IFO0347)、スフィンゴモナス・パラパウシモビリス (*Sphingomonas parapaucimobilis* IFO15100)、スポトリクム・セルロフィリウム (*Sporotrichum cellulophilium* ATCC20493)、シンポジオミコプシス・パフィオペジリ (*Sympodiomyopsis paphiopedili* JCM8318)、ステ
- 10 リグマトスポリジウム・ポリモルファ (*Sterigmatosporidium polymorphum* IFO10121)、スフィンゴモナス・アドヘシバ (*Sphingomonas adhesiva* JCM7370)、タファリナ・カエルレスセンス (*Tapharina caerulescens* CBS351.35)、トレメラ・メセンテリカ (*Tremella mesenterica* ATCC24438)、トリコスポロン・クタネウム (*Trichosporon cutaneum* IFO1198)、チレチアリア・アノマラ (*Tilletiaria anomala* CBS436.72)、チレチア・カリエス (*Tilletia caries* JCM1761)、トリボ
- 15 スポリウム・ブラタム (*Tolyposporium bullatum* JCM2006)、チレチオプシス・ワシントネシス (*Tilletiopsis washintonensis* CBS544)、ウスチラゴ・エスクレンタ (*Ustilago esculenta* IFO9887)、ウデニオミセス・メガロスポラス (*Udeniomyces megalosporus* JCM5269)、キサントフィロミセス・デンドロロウス (*Xanthophyllomyces dendrorhous* IFO10129)、キサントバクテリウム・フラプス (*Xanthobacter flavus* JCM1204)、ペキロマイセス・リアシヌス (*Paecilomyces lilacinus* ATCC10114)、アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum* ATCC11550)、ハイホモナス・ヒシアナ (*Hyphomonas hirschiana* ATCC33886)、リゾビウム・メロッティ (*Rhizobium meliloti* ATCC9930) 等が挙げられる。
- 25 還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物としては、上記微生物の野生株のみならず、例えば、上記の微生物の還元型補酵素 Q_{10} 生合成に関与する遺伝子の転写及び翻訳活性、或いは発現蛋白質の酵素活性を、改変或いは改良した微生物も好ましく使用することができる。

遺伝子の転写及び翻訳活性、或いは発現蛋白質の酵素活性を、改変或いは改良

する手段としては、遺伝子組換え（自己遺伝子の改良、増幅、破壊や、外来遺伝子の導入及び該遺伝子の改良、増幅を含む）や、変異原による変異誘発が挙げられるが、変異原による変異誘発が好ましい。

- 本発明に使用しうる、より好ましい微生物は、上記改変或いは改良した微生物、
- 5 好ましくは変異原により変異処理した微生物を、前記増殖方法並びに測定方法により評価した場合に、還元型補酵素 Q_{10} が全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上、より好ましくは80モル%以上、さらに好ましくは85モル%以上、特に好ましくは90モル%以上の含量を示す微生物である。工業規模での発酵生産においては、さらに、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生
- 10 産能力として、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、好ましくは $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、より好ましくは $3\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、さらに好ましくは $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、特に好ましくは $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、特により好ましくは $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 、最も好ましくは $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の生産能力を有する微生物を用いるのが良い。

- 変異誘発は単一の変異誘発として行うことができるが、2回以上の変異誘発を行うのが好ましい。各変異誘発段階により還元型補酵素 Q_{10} を生産する能力が改良されることが見出されたからである。変異誘発処理にかけられる微生物細胞の候補としては、通常は、前記増殖方法並びに測定方法により評価した場合に
- 15 できるだけ高い還元型補酵素 Q_{10} 生産能力を有するものが好ましいことは言うまでもない。

- 20 変異誘発処理は、任意の適当な変異原を用いて行うことができる。「変異原」なる語は、広義の意味において、例えば変異誘発効果を有する薬剤のみならず、UV照射のような変異誘発効果を有する処理も含む。適当な変異原の例として、エチルメタンスルホネート、UV照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、プロモウラシルのようなヌクレオチド塩基類似体及びアクリジン
- 25 類等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

常用の変異誘発技法に従えば、変異誘発に続き、高い還元型補酵素 Q_{10} 生産能力を有する微生物細胞の適切な選択を行う。このためには、単一コロニーから作られた培養物の評価を、例えば、前記増殖方法並びに測定方法を用いて行うことである。還元型補酵素 Q_{10} の結晶は白色の固層又は無色の液相を形成するた

め、コロニーの選別時には、前記測定法により還元型補酵素 Q_{10} 生産能力の評価を好適に行うことができる。

本発明の方法において、工業的規模での発酵生産における還元型補酵素 Q_{10} の高い生産性は、部分的には、前記の還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち
5 70モル%以上の比率で含有する微生物細胞の使用により得られ、また、部分的には、以下に記載される培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力を高めるための好適な培養（発酵）条件の使用により得られる。そして特に、上記の好適な微生物細胞の使用と以下の好適な培養（発酵）条件の使用とを組み合わせるのが好ましい。

- 10 培養は、通常、微生物の増殖に適した多量栄養素や微量栄養素を含んでなる培地中で行われる。上記栄養素は、例えば、炭素源（例えば、グルコース、シュークロース、マルトース、デンプン、コーンシロップ、糖蜜等の炭水化物；メタノール、エタノール等のアルコール等）、窒素源（例えば、コーンステープリカー、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、尿素、ペプトン
15 等）、リン源（例えば、リン酸アンモニウム、リン酸等）、並びに、微量栄養素（例えば、マグネシウム、カリウム、亜鉛、銅、鉄、マンガン、モリブデン、硫酸、塩酸等のミネラル；ビオチン、デスチオビオチン、ビタミンB1等のビタミン類；アラニン、ヒスチジン等のアミノ酸；酵母エキスをマルトエキス等のビタミン類を含有する天然原料等）からなるが、これらに制限されるものではなく、
20 一般的に使用されるものを用いることができる。なお、酵母エキス等の天然培地成分中には、リン酸塩等のリン源も含まれる。また、上記の栄養素は、適宜、組み合わせて用いられる。

- 培養の温度は、通常、15～45℃、好ましくは20～37℃で行われる。15℃未満では、工業生産のために許容されるには微生物の増殖速度が低くなる傾向があり、45℃を越える高温では、微生物の生存が傷害され易い傾向にある。
25

培養のpHは、通常4～9、好ましくは5～8である。pH3以下及び、pH10以上では微生物の増殖が阻害され易い傾向がある。

工業規模での発酵生産においては、微生物の種類にもよるが、培養中、炭素源（生成したアルコールも含む）の濃度を、還元型補酵素 Q_{10} 生産能力に実質的

に悪影響を及ぼさない濃度に制御するのが好ましい。よって、培養液中の炭素源の濃度が、還元型補酵素 Q_{10} 生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度、つまり、通常 20 g/L 以下、好ましくは 5 g/L 以下、より好ましくは 2 g/L 以下となるように、培養を制御するのが好ましい。

- 5 炭素源の濃度制御のためには、流加培養法を採用するのが好ましい。pH、溶存酸素濃度(DO)或いは残糖濃度等の培養管理指標に基づき、栄養源(特に炭素源)の供給を調節することにより、培養液中の炭素源濃度を制御することができる。栄養源の供給は、微生物の種類にもよるが、培養の当初から開始しても良いし、培養途中から開始してもよい。栄養源の供給は、連続的であっても良いし、断続的であってもよい。なお、栄養源の供給にあたっては、上記炭素源を他の成分から分離して(別に)培地に供給するのが好ましい。

培養は、所望の還元型補酵素 Q_{10} の生産量に達した時点で終了することができる。培養時間は特に制限されないが、通常、 $20\sim 200$ 時間である。

- 上記の培養は、通常、好氣的に行われる。ここで、「好氣的」なる語は、培養中に酸素の制限(酸素の欠乏)が生じないように酸素の供給が行われることを意味し、好ましくは、培養中に酸素の制限が実質的に生じないように酸素の供給が充分に行われることを意味する。培養は、通常は通気下、好ましくは通気攪拌下に行われる。

- 上記のような微生物、並びに培養条件を用いることにより、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得ることができる。また、還元型補酵素 Q_{10} の生産量も、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、好ましくは $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、さらに好ましくは $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上という高い値が得られる。

次に、上記培養により生産された還元型補酵素 Q_{10} の回収について説明する。

- 25 本発明において、工業的規模での還元型補酵素 Q_{10} の効率的な製造は、部分的には、上記の好適な培養によって可能となり、また、部分的には、以下の還元型補酵素 Q_{10} の好適な回収操作によって可能となる。

還元型補酵素 Q_{10} の回収は、上記培養で得られた微生物細胞からの有機溶剤を用いる抽出により行われる。

抽出に際しては、所望により前記細胞を破碎することができる。細胞の破碎は、細胞中に生産・蓄積された還元型補酵素 Q_{10} の効率的な抽出に寄与する。言うまでもなく、細胞の破碎と抽出とを同時に行っても良い。

5 なお、本発明の「破碎」においては、還元型補酵素 Q_{10} の抽出が可能となる程度に細胞壁等の表面構造が損傷を受ければよく、必ずしも微生物細胞が破れる或いは断片化される必要はない。

10 また、上記の細胞破碎処理は、細菌では必ずしも必要ではない場合もある。しかし、酵母やカビでは、通常、細胞破碎処理は必要であり、細胞が破碎されていない場合、細胞中に生産・蓄積された還元型補酵素 Q_{10} は効率的に回収されにくくなる。

上記微生物細胞の破碎は、以下の1つ又は幾つかの破碎方法を任意の順序で行うことにより行われる。破碎方法としては、例えば、物理的处理、化学的处理、酵素的処理の他、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、原形質溶解等を挙げることができる。

15 上記物理的处理としては、例えば、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレス、ボールミル等の使用、或いは、これらの組み合わせを挙げることができる。

20 上記化学的处理としては、例えば、塩酸、硫酸等の酸（好ましくは強酸）を用いる処理、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等の塩基（好ましくは強塩基）を用いる処理等や、これらの組み合わせを挙げることができる。

上記酵素的処理としては、例えば、リゾチーム、ザイモリアーゼ、グルカナーゼ、ノボザイム、プロテアーゼ、セルラーゼ等を用いる方法を挙げることができ、適宜これらを組み合わせて用いても良い。

25 上記加熱処理としては、例えば、60～100℃で30分～3時間程度の処理を挙げることができる。

上記自己消化としては、例えば、酢酸エチル等の溶媒による処理を挙げることができる。

また、細胞内の塩濃度と異なる溶液により細胞を処理することにより細胞が破壊される浸透圧溶解や原形質溶解は、本方法単独では破碎効果が不十分な場合が

多く、上記物理的处理、化学的处理、酵素的处理、加熱処理、自己消化等と合わせて用いられることが多い。

還元型補酵素 Q_{10} の抽出・回収の前処理としての細胞破碎方法としては、上記破碎方法の中でも、物理的处理、化学的处理（特に酸処理、好ましくは強酸（
5 例えば、水溶液中における pK_a が2.5以下の酸）により後述するような還元型補酵素 Q_{10} が酸化反応から防護された条件下での酸処理）や加熱処理が好ましく、破碎効率の点から物理的处理がより好ましい。

従来、細胞破碎並びに補酵素 Q_{10} の抽出方法、具体的には、水酸化ナトリウム及びピロガロールの存在下に有機溶剤で抽出する方法は、コスト、廃棄物処理、
10 廃微生物（廃菌体）有効利用（タンパク質の回収等）時の安全性等の面で問題があった。しかし、本発明における細胞破碎方法、とりわけ物理的处理法は、中和により多量の塩を副生することがなく、廃棄物処理のみならず廃微生物（廃菌体）の有効利用の面からも好適な方法である。

上記の細胞破碎に用いる微生物細胞の形態は、培養液、培養液を濃縮したもの、
15 培養液から微生物細胞を湿菌体として採取したもの、これらを洗浄したもの、湿菌体を溶剤（例えば、水、生理食塩水、緩衝液等も含む）に懸濁したもの、前記の湿菌体を乾燥させた乾燥菌体、乾燥菌体を溶剤（例えば、水、生理食塩水、緩衝液等も含む）に懸濁したもの等であってよいが、好ましくは微生物細胞の水性懸濁液であり、操作性等の面から、より好ましくは、培養液、培養液を濃縮した
20 ものや、これらを洗浄したものである。

還元型補酵素 Q_{10} の抽出・回収に用いる前記微生物細胞又は該細胞破碎物の形態も、上記と同様、特に制限されず、微生物細胞又は該細胞破碎物の湿菌体や乾燥菌体であってもよいが、好ましくは、微生物細胞又は該細胞破碎物の水性懸濁液であり、より好ましくは、培養液、培養液を濃縮及び／又は洗浄したものや、
25 これらの破碎液（いずれも水性懸濁液）である。

上記の微生物細胞又は該細胞破碎物の懸濁液における菌体濃度は、特に制限されず、乾燥重量で通常1～25重量%にて行いうるが、経済的には10～20重量%であるのが好ましい。

このようにして得られる前記微生物細胞及び該細胞破碎物を、有機溶剤を用い

る抽出に付すことによって、還元型補酵素 Q_{10} を回収することができる。

抽出に用いる有機溶剤としては、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類、アルコール類、脂肪酸類、ケトン類、窒素化合物類（ニトリル類、アミド類を含む）、硫黄化合物類等を挙げることができる。

- 5 特に、還元型補酵素 Q_{10} の抽出に際しては、分子酸素による酸化から防護する観点から、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類、及び、ニトリル類のうちの少なくとも一種を抽出溶媒として用いるのが好ましく、なかでも、炭化水素類、脂肪酸エステル類が好ましく、炭化水素類が最も好ましい。

- 10 工業的規模での製造においては、酸素の完全な除去は極めて難しく、さらに個々の操作に要する時間はラボスケールでの製造とは異なりかなり長時間になるために、残存する酸素が大きな悪影響を及ぼす。上記酸化は還元型補酵素 Q_{10} からの酸化型補酵素 Q_{10} の副生に直結する。従って、還元型補酵素 Q_{10} の抽出における上記酸化防護効果の高い有機溶剤（炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類、ニトリル類等）の使用は、効率的な抽出を助成する。

- 15 炭化水素類としては、特に制限されないが、例えば、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、ハロゲン化炭化水素等を挙げることができる。脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素が好ましく、脂肪族炭化水素がより好ましい。

- 脂肪族炭化水素としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数
20 3～20、好ましくは炭素数5～12、より好ましくは炭素数5～8のものが用いられる。具体例としては、例えば、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、ノナン、
25 2, 2, 5-トリメチルヘキサン、デカン、ドデカン、2-ペンテン、1-ヘキセン、1-ヘプテン、1-オクテン、1-ノネン、1-デセン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン、p-メンタン、シクロヘキセン等を挙げることができる。好ましくは、

ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、
5 ノナン、2, 2, 5-トリメチルヘキサン、デカン、ドデカン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン、p-メンタン等である。より好ましくは、ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、
10 シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン等である。

一般に、ヘプタン類、ヘプタンはもちろん、炭素数7を有するメチルシクロヘキサン等の異種ヘプタンやそれらの複数混合物が好ましく用いられる。さらに好ましくは、炭素数5のペンタン類（例えば、ペンタン等）、炭素数6のヘキサン類（例えば、ヘキサン、シクロヘキサン等）、炭素数7のヘプタン類（例えば、ヘプタン、メチルシクロヘキサン等）等である。特に好ましくは、上記酸化からの防護効果が特に高いという点から、ヘプタン類（例えば、ヘプタン、メチルシクロヘキサン等）等であり、最も好ましくはヘプタンである。
20

芳香族炭化水素としては、特に制限されないが、通常、炭素数6～20、好ましくは炭素数6～12、より好ましくは炭素数7～10のものが用いられる。具体例としては、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、クメン、メシチレン、テトラリン、ブチルベンゼン、p-シメン、シクロヘキシルベンゼン、ジエチルベンゼン、ペンチルベンゼン、ジペンチルベンゼン、ドデシルベンゼン、スチレン等を挙げることができる。好ましくは、トルエン、キシレン、o-キシレン、m-キシレン、p-キシレン、エチルベンゼン、クメン、メシチレン、テトラリン、ブチルベンゼン、p-シメン、シクロヘキシルベンゼン、ジエチルベンゼン、ペンチルベン

ゼン等である。より好ましくは、トルエン、キシレン、*o*-キシレン、*m*-キシレン、*p*-キシレン、クメン、テトラリン等である。最も好ましくは、クメンである。

ハロゲン化炭化水素としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、非環状のものが好ましく用いられる。より好ましくは塩素化炭化水素、フッ素化炭化水素であり、さらに好ましくは塩素化炭化水素である。また、炭素数1~6、好ましくは炭素数1~4、より好ましくは炭素数1~2のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 1-ジクロロエタン、1, 2-ジクロロエタン、1, 1, 1-トリクロロエタン、1, 1, 2-トリクロロエタン、1, 1, 1, 2-テトラクロロエタン、1, 1, 2, 2-テトラクロロエタン、ペンタクロロエタン、ヘキサクロロエタン、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1, 2-ジクロロプロパン、1, 2, 3-トリクロロプロパン、クロロベンゼン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン等を挙げることができる。好ましくは、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 1-ジクロロエタン、1, 2-ジクロロエタン、1, 1, 1-トリクロロエタン、1, 1, 2-トリクロロエタン、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、クロロベンゼン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン等である。より好ましくは、ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、クロロベンゼン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン等である。

脂肪酸エステル類としては、特に制限されないが、例えば、プロピオン酸エステル、酢酸エステル、ギ酸エステル等を挙げることができる。好ましくは、酢酸エステル、ギ酸エステルであり、より好ましくは酢酸エステルである。エステル基としては、特に制限されないが、通常、炭素数1~8のアルキルエステル、炭素数7~12のアラルキルエステルが、好ましくは炭素数1~6のアルキルエステルが、より好ましくは炭素数1~4のアルキルエステルが用いられる。

プロピオン酸エステルの具体例としては、例えば、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル、プロピオン酸イソペンチル等を挙げるこ

とができる。好ましくはプロピオン酸エチル等である。

酢酸エステルの具体例としては、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロ
ピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸 *sec*-ブチル、
5 酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、酢酸 *sec*-ヘキシル、酢酸シクロヘキシル、
酢酸ベンジル等を挙げることができる。好ましくは、酢酸メチル、酢酸エチル、
酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸 *sec*-
ブチル、酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、酢酸 *sec*-ヘキシル、酢酸シクロ
ヘキシル等である。より好ましくは、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、
酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル等であり、最も好ましくは、酢
10 酸エチルである。

ギ酸エステルの具体例としては、例えば、ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロ
ピル、ギ酸イソプロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、ギ酸 *sec*-ブチル、
ギ酸ペンチル等を挙げることができる。好ましくは、ギ酸メチル、ギ酸エチル、
ギ酸プロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、ギ酸ペンチル等である。最も好ま
15 しくは、ギ酸エチルである。

エーテル類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特
に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数3
~20、好ましくは炭素数4~12、より好ましくは炭素数4~8のものが用い
られる。具体例としては、例えば、ジエチルエーテル、メチル *tert*-ブチル
20 エーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、
ジヘキシルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル、アニソ
ール、フェネトール、ブチルフェニルエーテル、メトキシトルエン、ジオキサン、
フラン、2-メチルフラン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、エチレ
ングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、エチレ
25 ングリコールジブチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチ
レングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールモノブチルエーテル等
を挙げることができる。好ましくは、ジエチルエーテル、メチル *tert*-ブチ
ルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、
ジヘキシルエーテル、アニソール、フェネトール、ブチルフェニルエーテル、メ

トキシトルエン、ジオキサン、2-メチルフラン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、エチレングリコールジブチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル等である。より好ましくは、ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、アニソール、ジオキサン、テトラヒドロフラン、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル等である。さらに好ましくは、ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、アニソール等であり、最も好ましくは、メチルtert-ブチルエーテルである。

- 10 アルコール類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数1~20、好ましくは炭素数1~12、より好ましくは炭素数1~6である。なかでも、炭素数1~5の1価アルコール、炭素数2~5の2価アルコール、炭素数3の3価アルコールが好ましい。
- 15 これらアルコール類の具体例としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、tert-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール、1-ヘキサノール、2-メチル-1-ペンタノール、4-メチル-2-ペンタノール、2-エチル-1-ブタノール、1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、3-ヘプタノール、1-オクタノール、2-オクタノール、2-エチル-1-ヘキサノール、1-ノナノール、1-デカノール、1-ウンデカノール、1-ドデカノール、アリルアルコール、プロパルギルアルコール、ベンジ
- 20 ルアルコール、シクロヘキサノール、1-メチルシクロヘキサノール、2-メチルシクロヘキサノール、3-メチルシクロヘキサノール、4-メチルシクロヘキサノール等の1価アルコール；1, 2-エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-プロパンジオール、1, 2-ブタンジオール、1, 3-ブタンジオール、1, 4-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオール、1, 5-ペンタン

ジオール等の2価アルコール；グリセリン等の3価アルコールを挙げることができる。

- 1価アルコールとしては、好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、*tert*-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール、1-ヘキサノール、2-メチル-1-ペンタノール、4-メチル-2-ペンタノール、2-エチル-1-ブタノール、1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、3-ヘプタノール、1-オクタノール、2-オクタノール、2-エチル-1-ヘキサノール、1-ノナノール、1-デカノール、1-ウンデカノール、1-ドデカノール、ベンジルアルコール、シクロヘキサノール、1-メチルシクロヘキサノール、2-メチルシクロヘキサノール、3-メチルシクロヘキサノール、4-メチルシクロヘキサノール等である。より好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、*tert*-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール、1-ヘキサノール、2-メチル-1-ペンタノール、4-メチル-2-ペンタノール、2-エチル-1-ブタノール、シクロヘキサノール等である。さらに好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、*tert*-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール等である。特に好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール等であり、最も好ましくは、2-プロパノールである。

2価アルコールとしては、1, 2-エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-プロパンジオール等が好ましく、1, 2-エタンジオールが最も好ましい。3価アルコールとしては、グリセリンが好ましい。

脂肪酸類としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸等を挙げることができる。好ましくは、ギ酸、酢酸であり、最も好ましくは酢酸である。

ケトン類としては、特に制限されず、炭素数3～6のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、アセトン、メチルエチルケトン、メチルブチルケトン、メチルイソブチルケトン等を挙げることができる。好ましくは、アセトン、メチルエチルケトンであり、最も好ましくはアセトンである。

ニトリル類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に飽和のものが好ましく用いられる。通常、炭素数2～20、好ましくは炭素数2～12、より好ましくは炭素数2～8のものが用いられる。

具体例としては、例えば、アセトニトリル、プロピオニトリル、マロニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、スクシノニトリル、バレロニトリル、グルタロニトリル、ヘキサニトリル、ヘプチルシアニド、オクチルシアニド、ウンデカンニトリル、ドデカンニトリル、トリデカンニトリル、ペンタデカンニトリル、ステアロニトリル、クロロアセトニトリル、ブromoアセトニトリル、クロロプロピオニトリル、ブromoプロピオニトリル、メトキシアセトニトリル、シアノ酢酸メチル、シアノ酢酸エチル、トルニトリル、ベンゾニトリル、クロロベンゾニトリル、ブromoベンゾニトリル、シアノ安息香酸、ニトロベンゾニトリル、アニソニトリル、フタロニトリル、ブromotolニトリル、メチルシアノベンゾエート、メトキシベンゾニトリル、アセチルベンゾニトリル、ナフトニトリル、ビフェニルカルボニトリル、フェニルプロピオニトリル、フェニルブチロニトリル、メチルフェニルアセトニトリル、ジフェニルアセトニトリル、ナフチルアセトニトリル、ニトロフェニルアセトニトリル、クロロベンジルシアニド、シクロプロパンカルボニトリル、シクロヘキサニカルボニトリル、シクロヘプタンカルボニトリル、フェニルシクロヘキサニカルボニトリル、トリルシクロヘキサニカルボニトリル等を挙げることができる。

- 好ましくは、アセトニトリル、プロピオニトリル、スクシノニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリル、バレロニトリル、シアノ酢酸メチル、シアノ酢酸エチル、ベンゾニトリル、トルニトリル、クロロプロピオニトリルであり、より好ましくは、アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル、イソブチロニトリルであり、最も好ましくは、アセトニトリルである。

ニトリル類を除く窒素化合物類としては、例えば、ホルムアミド、N-メチルホルムアミド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等のアミド類やニトロメタン、トリエチルアミン、ピリジン等を挙げることができる。

- 10 硫黄化合物類としては、例えば、ジメチルスルホキシド、スルホラン等を挙げることができる。

- 上記有機溶剤の中でも、沸点、粘性等の性質（例えば、溶解度を高めるための適度な加温ができ、且つ、湿体からの溶剤の乾燥除去や晶析濾液等からの溶剤回収の行いやすい沸点（1気圧下、約30～150℃）、室温での取り扱い時及び
15 室温以下に冷却した時も固化しにくい融点（約0℃以上、好ましくは約10℃以上、より好ましくは約20℃以上）を持ち、粘性が低い（20℃において約10 c p 以下等））を考慮して選定するのが好ましい。

- 溶剤中での還元型補酵素Q₁₀の酸化防護効果は、還元型補酵素Q₁₀の高濃度溶液において高まる傾向がある。還元型補酵素Q₁₀は、酸化防護効果の高い上記有機溶剤（例えば、炭化水素類、脂肪酸エステル類等）に対して高い溶解性を示し、この高い溶解性は、高濃度溶液での取り扱いを可能とし、酸化防護を助成する。還元型補酵素Q₁₀の酸化防護効果のための好ましい抽出時の濃度は、特に制限されないが、上記有機溶剤に対する還元型補酵素Q₁₀の濃度として、通常0.001重量%以上、好ましくは0.01重量%以上、より好ましくは0.
20 1重量%以上である。上限は特に制限されないが、通常10重量%以下である。

上記有機溶剤のうち、微生物細胞又は該細胞破碎物の湿菌体や乾燥菌体から、還元型補酵素Q₁₀を抽出・回収するには、親水性有機溶剤を用いるのが好ましい。具体的には、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール等を挙げることができる。

また、上記有機溶剤のうち、微生物細胞又は該細胞破砕物の水性懸濁液から、還元型補酵素 Q_{10} を抽出・回収するには、疎水性有機溶剤を用いるのが好ましく、これは微生物由来の水溶性物質の除去を助成する。疎水性有機溶剤の多くは、先の酸化防護効果の高い有機溶剤であり、極めて好都合である。

- 5 また、疎水性有機溶剤としては、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類が好ましい。

ところで、上記抽出操作において、微生物細胞又は該細胞破砕物の水性懸濁液、特に該細胞破砕物の水性懸濁液、とりわけ物理的処理による該細胞破砕物の水性懸濁液から有機溶剤を用いて抽出する場合、一部タンパク質等の細胞成分の存在
10 によりエマルジョンが形成されやすく、相分離が困難になり易い傾向があるので、上記エマルジョンの形成を抑制して、効率よく抽出することが重要となる。

そのためには、抽出溶剤として、上記疎水性有機溶剤に加えて、補助的溶剤として親水性有機溶剤を併用するのが好ましい。

- 15 この場合、疎水性有機溶剤としては、特に制限されず、上述のものを使用できるが、好ましくは炭化水素類、より好ましくは脂肪族炭化水素である。脂肪族炭化水素のなかでも、炭素数5～8のものが好適に用いられる。

上記炭素数5～8の脂肪族炭化水素の具体例としては、例えば、ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、
20 3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン等を挙げることができる。特に好ましくは、ヘキサン、ヘプタン、メチルシクロヘキサンであり、最も好ましくは、ヘキサン、ヘプタンである。

- 25 上記の疎水性有機溶剤と組み合わせて用いられる親水性有機溶剤としては、特に制限されず、上述のものを使用するが、好ましくは、アルコール類である。アルコール類のなかでも、炭素数1～5の1価アルコールが好適に用いられる。これらの具体例としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、

- t e r t -ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、t e r t -ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール等を挙げることができる。特に好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールであり、最も好ましくは、2-プロパノールである。

上記の親水性有機溶剤と疎水性有機溶剤の使用量としては、特に制限はされないが、抽出時の濃度として、全溶液の容量に対して、好ましくは親水性有機溶剤が5～50容量%、疎水性有機溶剤が25～65容量%の範囲である。

- 還元型補酵素 Q_{10} の回収において、抽出時の温度は、特に制限されないが、通常0～60℃、好ましくは20～50℃の範囲である。

- 抽出方法としては、回分抽出、連続抽出（好ましくは、向流多段抽出）のどちらの方法でも行うことができるが、連続抽出（好ましくは、向流多段抽出）が、生産性の面で特に好ましい。回分抽出における攪拌時間は、特に制限されないが、通常5分以上であり、連続抽出における平均滞留時間は、特に制限されないが、通常10分以上である。

- 還元型補酵素 Q_{10} の回収に際しては、還元型補酵素 Q_{10} が分解しないように（例えば、酸化型補酵素 Q_{10} に酸化されないように）留意するのが好ましい。そのためには、上記の抽出（細胞破碎も含む）は、酸性～弱塩基性条件下、好ましくは酸性～中性条件下に行うのが好適である。pHを指標とする場合は、接触時間にもよるが、pH10以下、好ましくはpH9以下、より好ましくはpH8以下、さらに好ましくはpH7以下である。

- 以上により、実質的に酸化反応を防護しうるが、所望によって、より厳密には、還元型補酵素 Q_{10} が酸化反応から防護された条件下に、上記の細胞の破碎及び／又は抽出を行うのが好ましい。当該条件下に少なくとも上記抽出を行うのがより好ましく、上記破碎及び抽出を行うのがさらに好ましい。

「酸化反応から防護された条件下」としては、例えば、脱酸素雰囲気下（窒素ガス、炭酸ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス、水素ガス等の不活性ガス雰囲気下、減圧下、沸騰下等）；高塩濃度下、例えば、好ましくは水相の塩類（例えば、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム等の無機塩）の濃度が約5%以上である条件下

；強酸（例えば、水溶液中における pK_a が 2.5 以下の酸）存在下、例えば、還元型補酵素 Q_{10} の 1 モルに対して強酸 0.1 モル%以上が存在する条件下；酸化防止剤存在下、例えば、アスコルビン酸、クエン酸、それらの塩やエステル類の共存下（例えば、還元型補酵素 Q_{10} に対して 0.1 重量%以上）等を挙げることができる。また、還元条件下（酸化型補酵素 Q_{10} が還元型補酵素 Q_{10} に変換されうる条件）、例えば、次亜硫酸類等の還元剤との接触も挙げられる。

以上の培養（発酵）及び抽出によって、還元型補酵素 Q_{10} は、好適に生産及び回収される。好ましくは、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち 70 モル%以上、好ましくは 75 モル%以上の比率で含有する抽出液を得る。

- 10 このようにして得られた還元型補酵素 Q_{10} を含有する抽出液を、所望によりカラムクロマトグラフィー、還元処理等により精製した後、晶析操作を用いて、高純度の還元型補酵素 Q_{10} 結晶を取得することができる。なお、この場合も、一連の操作は、上述した「酸化反応から防護された条件下」に行うのが好ましい。

- 15 本発明では、また、上記微生物細胞又は該細胞破砕物を酸化処理に付した後に酸化型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出するか、或いは、前記微生物細胞又は該細胞破砕物から還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出し、必要により精製処理を施した後、これを酸化処理に付すことにより、酸化型補酵素 Q_{10} を製造することができる。

- 20 上記酸化は、例えば、還元型補酵素 Q_{10} （好ましくは、上述した還元型補酵素 Q_{10} を含有する微生物細胞又は該細胞破砕物の水性懸濁液や還元型補酵素 Q_{10} の抽出液等）と酸化剤（例えば、二酸化マンガン等）を混合し、例えば、室温（例えば、30℃）で 30 分以上処理することにより行うことができる。微生物細胞又は該細胞破砕物を酸化処理に付した場合は、酸化型補酵素 Q_{10} の抽出操作を、上述の還元型補酵素 Q_{10} の抽出操作と同様に行うことができ、それにより酸化型補酵素 Q_{10} を効率よく回収することができる。尚、酸化型補酵素 Q_{10} の回収は、還元型補酵素 Q_{10} の回収において推奨される「酸化反応から防護された条件下」に行う必要性はなく、通常的安全操作等を配慮して実施すればよい。このようにして得られる酸化型補酵素 Q_{10} は、所望によりカラムクロマトグラフィー等による精製を施しても良く、最終的に晶析操作を用いて、高純度の酸化
- 25

型補酵素 Q_{10} 結晶として取得することができる。

図面の簡単な説明

図1は、実施例8で用いた向流3段連続抽出装置の概略図である。

5

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

10 (実施例1)

下記表1～3の各種補酵素 Q_{10} 生産性微生物を、試験管（内径21mm、全長200mm）を用いて、10mLの培地〔（グルコース20g、ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g）／L、pH6.0〕中で25℃、72時間振とう培養（振幅2cm、310往復／分）し、得られた増殖液を必要に応じ濃縮し、窒素雰囲気下、該増殖液10容量部に対してイソプロパノール3容量部及びn-ヘキサン18.5容量部の共存下に、ガラスビーズ（425～600ミクロン）10容量部を用いて、3分間激しく振とうして細胞の破碎及び抽出を行った。得られたヘキサン相を減圧下にエバポレートし（40℃）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析して、還元型補酵素 Q_{10} 比率、並びに、還元型補酵素 Q_{10} 生産量を調べた。

HPLC条件

カラム：YMC-Pack 4.6×250mm（YMC. Co., Ltd. 製）

移動相：メタノール／n-ヘキサン＝85／15

25 流速：1mL／分

検出：UV275nm

結果を表1～3に示す。なお、還元型補酵素 Q_{10} 比率とは、還元型補酵素 Q_{10} 及び酸化型補酵素 Q_{10} のピークの面積及び両者のモル吸光係数の比（1：7.5）をもとに、酸化型補酵素 Q_{10} と還元型補酵素 Q_{10} の総和に対する還元型補

酵素 Q₁₀ の割合をモル百分率で表した値を意味する。

表 1

| 菌株名 | | 上段:還元型補酵素Q10比率(%) |
|-----|---|------------------------|
| | | 下段:還元型補酵素Q10生産量(μg/ml) |
| 5 | アグロバクテリウム・ツメファシエンシス IFO 13263 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) | 82 |
| | | 7 |
| | アグロバクテリウム・ラジオバクター ATCC 4718 (<i>Agrobacterium radiobacter</i>) | 78 |
| | | 7 |
| | アスペルギルス・クラバータス JCM 1718 (<i>Aspergillus clavatus</i>) | 83 |
| 10 | | 2 |
| | アセトバクター・キシリヌム IFO15237 (<i>Acetobacter xylinum</i>) | 77 |
| | | 2 |
| | アミノバクター・アガノウエンシス JCM 7854 (<i>Aminobacter aganouensis</i>) | 70 |
| | | 3 |
| 15 | アグロモナス・オリゴトロフィカ JCM 1494 (<i>Agromonas oligotrophica</i>) | 75 |
| | | 2 |
| | アシドフィラス・マルチボルム JCM 8867 (<i>Acidiphilium multivorum</i>) | 73 |
| | | 3 |
| | ブレロミセス・アルバス IFO 1192 (<i>Bulleromyces albus</i>) | 72 |
| 20 | | 2 |
| | ブレラ・アルメニカ IFO 10112 (<i>Bullera armeniaca</i>) | 85 |
| | | 7 |
| | ブレブンジモナス・ジミヌタ JCM 2788 (<i>Brevundimonas diminuta</i>) | 82 |
| | | 5 |
| 25 | クリプトコッカス・ラウレンティー IFO 0609 (<i>Cryptococcus laurentii</i>) | 79 |
| | | 6 |
| | キオノスファエラ・アポバシジアルリス CBS 7430 (<i>Chionosphaera apobasidialis</i>) | 71 |
| | | 2 |
| | カンジタ・クルバータ ATCC 10567 (<i>Candida curvata</i>) | 74 |
| | | 3 |
| | セリノステルス・ルテオアルバス JCM 2923 (<i>Cerinosterus luteoalbus</i>) | 79 |
| | | 5 |
| | エキソフィアラ・アルカロフィラ JCM12519 (<i>Exisophiala alcalophila</i>) | 77 |
| | | 3 |
| | エキソバシジウム・グラシル IFO7788 (<i>Exobasidium gracile</i>) | 79 |
| | | 2 |
| | フィロミセス・フゾエンシス IFO 10374 (<i>Fellomyces fuzhouensis</i>) | 70 |
| | | 2 |
| | フィロバシジエラ・ネオフォルマス CBS 132 (<i>Filobasidiella neoformans</i>) | 88 |
| | | 2 |
| | フィロバシジウム・カプスロイゲヌム CBS 1906 (<i>Filobasidium capsuloigenum</i>) | 82 |
| | | 3 |
| | ゲオトリカム・カピタウム JCM 6258 (<i>Geotrichum capitatum</i>) | 77 |
| | | 3 |
| | グラフィオラ・シリンドリカム IFO 6426 (<i>Graphiola cylindrica</i>) | 75 |
| | | 4 |
| | グルコノバクター・スボキシダンス IFO 3257 (<i>Gluconobacter suboxydans</i>) | 86 |
| | | 6 |
| | コッコバエラ・イムペラタエ JCM 7826 (<i>Kockovaella imperatae</i>) | 78 |
| | | 2 |

表 2

| | 菌株名 | 上段:還元型補酵素Q10比率(%) |
|----|--|------------------------------|
| | | 下段:還元型補酵素Q10生産量(μ g/ml) |
| 5 | クルツマノミセス・ネクタイレイ IFO 10118 (Kurtzmanomyces nectairei) | 79 2 |
| | ララリア・セラシ CBS 275.28 (Lalaria cerasi) | 75 2 |
| | ロイコスפורジウム・スコティー IFO 1212 (Leucosporidium scottii) | 88 6 |
| | レギオネラ・アニーサ JCM 7573 (Legionella anisa) | 73 3 |
| | メチロバクテリウム・エキトルゲエンス JCM 2802 (Methylobacterium extorguens) | 72 2 |
| 10 | ミコプラナ・ラモーサ JCM 7822 (Mycoplasma ramosa) | 80 2 |
| | オースפורジウム・マルガリチフェルム CBS2531 (Oosporidium margaritiferrum) | 76 2 |
| | シュードモナス・デニトリフィカンス IAM 12023 (Pseudomonas denitrificans) | 85 8 |
| | シュードモナス・シルキリエンシス IAM 1092 (Pseudomonas shuykilliensis) | 84 6 |
| | シュドジマ・アフィジス CBS 517.23 (Psedozyma aphidis) | 79 5 |
| 15 | パラコッカス・デニトリフィカンス JCM 6892 (Paracoccus denitrificans) | 83 5 |
| | ペトロミセス・アリアセウス IFO 7538 (Petromyces alliaceus) | 72 2 |
| | ロドトルラ・グルティニス IFO 1125 (Rhodotorula glutinis) | 79 7 |
| | ロドトルラ・ミヌタ IFO 0387 (Rhodotorula minuta) | 74 8 |
| | ロドスפורジウム・ジオボバツム ATCC 1830 (Rhodosporidium diobovatum) | 86 4 |
| 20 | リゾモナス・スベリファシエンシス IFO 15212 (Rhizomonas suberifaciens) | 82 2 |
| | ロドビウム・オリエンツ JCM 9337 (Rhodobium orientis) | 80 2 |
| | ロドプラネス・エレガンス JCM9224 (Rhodoplanes elegans) | 74 2 |
| | ロドシュードモナス・パルトリス JCM2524 (Rhodopseudomonas palustris) | 90 6 |
| | ロドバクター・カプスレータス SB 1003 (Rhodobacter capsulatus) | 95 6 |
| 25 | スポロボロミセス・ホルサティカス IFO 1034 (Sporobolomyces holsaticus) | 72 9 |
| | スポロボロミセス・パラロセウス IFO 0471 (Sporobolomyces pararoseus) | 93 8 |
| | スポリジオボラス・ジョンソニー IFO 1840 (Sporidiobolus johnsonii) | 73 7 |
| | サイトエラ・コンプリカタ IFO 10748 (Saitoella complicata) | 97 9 |

表 3

| | 菌株名 | 上段:還元型補酵素Q10比率(%) 下段:還元型補酵素Q10生産量(μ g/ml) | |
|----|---|---|----|
| | | | |
| 5 | シゾサッカロミセス・ポンペ IFO 0347 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) | 90 | 8 |
| | スフィンゴモナス・パラパウシモビリス IFO 15100 (<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>) | 78 | 7 |
| | スポトリクム・セルロフィリウム ATCC 20493 (<i>Sporotrichum cellulophilium</i>) | 73 | 6 |
| | シンポジオミコプシス・パフィオペジリ JCM 8318 (<i>Sympodiomyces paphiopedili</i>) | 80 | 6 |
| | ステリグマトスポリジウム・ポリモルファ IFO 10121 (<i>Sterigmatosporidium polymorphum</i>) | 72 | 2 |
| 10 | スフィンゴモナス・アドヘシバ JCM 7370 (<i>Sphingomonas adhesiva</i>) | 80 | 3 |
| | タファリナ・カエルレスセンス CBS 351.35 (<i>Tapharina caerulescens</i>) | 81 | 2 |
| | トレメラ・メセンテリカ ATCC 24438 (<i>Tremella mesenterica</i>) | 89 | 3 |
| | トリコスポロン・クタネウム IFO 1198 (<i>Trichosporon cutaneum</i>) | 95 | 8 |
| | チレチアリア・アノマラ CBS 436.72 (<i>Tilletiaria anomala</i>) | 75 | 4 |
| 15 | チレチア・カリエス JCM 1761 (<i>Tilletia caries</i>) | 80 | 3 |
| | トリボスポリウム・ブラタム JCM 2006 (<i>Tolyposporium bullatum</i>) | 73 | 4 |
| | チレチオプシス・ワシントンネシス CBS 544 (<i>Tilletiopsis washintonensis</i>) | 76 | 2 |
| | ウスチラゴ・エスクレンタ IFO 9887 (<i>Ustilago esculenta</i>) | 78 | 2 |
| | ウデニオミセス・メガロスポラス JCM 5269 (<i>Udeniomyces megalosporus</i>) | 87 | 2 |
| 20 | キサントフィロミセス・デンドロロウス IFO 10129 (<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>) | 84 | 2 |
| | キサントバクテリウム・フラブス JCM1204 (<i>Xanthobacter flavus</i>) | 80 | 2 |
| | ペキロマイセス・リアシヌス ATCC10114 (<i>Paecilomyces lilacinus</i>) | 80 | 5 |
| | アクレモニウム・クリソゲナム ATCC11550 (<i>Acremonium chrysogenum</i>) | 75 | 5 |
| | ハイホモナス・ヒシアナ ATCC33886 (<i>Hyphomonas hirschiana</i>) | 72 | 3 |
| 25 | リゾビウム・メロツティ ATCC9930 (<i>Rhizobium meliloti</i>) | 85 | 10 |

25 (実施例 2)

ロドトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis*) IFO1125 を培地 (ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、マルトエキス 3 g、グルコース 20 g/L、pH 6.0) で好氣的に 25℃で 48 時間培養した。培養後の菌体を遠心分離により集菌し、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン を 200 μ g/mL の濃度

になるように添加した pH 7 のリン酸緩衝液に懸濁した。25℃で1時間後、菌体を0.9%NaCl溶液で5回洗浄し、さらに0.9%NaCl溶液に再懸濁した。この細胞懸濁液を適度に希釈し、上記培地の寒天プレートにコロニーを形成させた。単離した変異株の還元型補酵素 Q_{10} の生産量及び還元型補酵素 Q_{10} の比率を実施例1と同様にして調べた。野生株と比較して生産量、還元型補酵素 Q_{10} の比率が高い株についてはさらに変異操作を繰り返した。その結果、10回の変異を繰り返すことにより、15 μ g/mL以上の生産能を示す変異株を得た。なお、この時の還元型補酵素 Q_{10} の比率は80モル%以上であった。

10 (実施例3)

サイトエラ・コンプリカタ (*Saitoella complicata*) IFO 10748 を培地 (ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g、グルコース20g/L、pH6.0) で好氣的に25℃で72時間10L培養した。得られた菌体を、窒素ガスで密閉したラニー社製圧力式ホモジナイザーにより破砕圧力80MPaで2回破砕し、菌体破砕液を調製した。この菌体破砕液からイソプロパノール30容量部、ヘキサン40容量部の割合で抽出を3回繰り返すことにより、抽出液を得た。抽出率は99%であり、還元型補酵素 Q_{10} の比率は97モル%であった。

(実施例4)

20 ロドトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis*) IFO1125 の変異株を培地10L (ペプトン10g、酵母エキス5g、マルトエキス3g、グルコース20g/L、pH6.0) で25℃で好氣的に培養する際に、48時間後よりグルコースを4g/時間の割合で96時間目までに流加した (流加グルコース量190g)。培地あたりの還元型補酵素 Q_{10} の生産量は20 μ g/mL以上であり、還元型補酵素 Q_{10} の比率は80モル%以上であった。

(実施例5)

実施例3で得られた抽出液をヘキサン溶液に置換し、シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、n-ヘキサン/ジエチルエーテル (9/1) 溶液で展開、溶出

して、還元型補酵素 Q_{10} を含む画分を得た。さらに、本画分を攪拌しながら 2°C まで冷却し、白色のスラリーを得た。以上すべての操作は窒素雰囲気下で行った。得られたスラリーを減圧ろ過し、湿結晶を上記展開液で洗浄し（洗浄に用いた溶媒の温度は 2°C ）、湿結晶を減圧乾燥（ $20\sim 40^{\circ}\text{C}$ 、 $1\sim 30\text{ mmHg}$ ）
5 することにより、白色の乾燥結晶 81 mg を得た。得られた結晶の純度は 99.9% 、還元型補酵素 Q_{10} の比率は $90\text{ mol}\%$ であった。

（実施例6）

実施例3で得られた抽出液を n -ヘキサンに置換し、二酸化マンガンを 50 mg
10 g 加え、 30°C で 30 分間攪拌した。この反応液を分取し、実施例5と同様にし
て精製すると高純度の酸化型補酵素 Q_{10} が 74 mg 得られた。

（実施例7）

サイトエラ・コンブリカタ (*Saitoella complicata*) IFO 10748 を培地（ペプト
15 $\text{N } 5\text{ g}$ 、酵母エキス 3 g 、マルトエキス 3 g 、グルコース 20 g/L 、 $\text{pH } 6.0$ ）で 25°C 、 72 時間好氣的に 500 mL 培養した。得られた菌体を、窒素ガ
スで密閉したラニー社製圧力式ホモジナイザーにより破砕圧力 80 MPa で 2 回
破砕し、菌体破砕液を調製した。破砕液中の還元型補酵素 Q_{10} の割合は、酸化
型も含めた全補酵素 Q_{10} に対し、 97% であった。この菌体破砕液 200 mL
20 に対し、イソプロパノール及び n -ヘキサンを、下記表4中の1回目抽出の欄で
示す比率で、溶剂量の合計が 500 mL となるよう混合し、温度 40°C で 30 分
間攪拌し、第1回目の抽出操作を行った。抽出終了後、 10 分間静置し、分離し
た上層を分離した。このときのトータル液量に対する下層（残渣）の容量比を、
分離性の指標とし、界面位置として表4中に示した。
25 さらに、第2回目の抽出を行うため、残渣層の溶剤濃度を測定して、全体の溶
剤比が表4中の2回目の欄で示す比率になるよう、イソプロパノールとヘキサン
を追加し、温度 40°C で 30 分間攪拌した。次いで、 10 分間静置し、上記と同
様に上層を分離し、残渣層の溶剤濃度を測定して、全体の溶剤比が表4中の3回
目の欄で示す比率になるよう、イソプロパノールとヘキサンを追加し、温度 25

℃で30分間攪拌し、第3回目の抽出操作とした。

第1回、第2回、第3回のそれぞれの段階で分離された上層中に含まれる還元型補酵素 Q_{10} の量の、抽出操作を行う前の菌体破碎液又は抽出残渣中に含まれる還元型補酵素 Q_{10} の量に対する比を、それぞれの段階での還元型補酵素 Q_{10} の抽出率とし、その計算結果を表4中に示した。また、第2回、第3回通算での補酵素 Q_{10} の抽出率も示した。いずれの段階においても、静置分離性は良好であり、3回の抽出を行った場合の通算抽出率は90%以上と、高い回収率を示した。特に、イソプロパノール濃度を30%以上とした場合は、99%以上の高い回収率となった。

10 表 4

| | | 溶剤割合(vol%) | | 界面位置 | 抽出率(%) | |
|-------|-----|------------|------|-------|--------|-------|
| | | イソプロパノール | ヘキサン | | 各回抽出率 | 通算抽出率 |
| Case1 | 1回目 | 18.8 | 52.7 | 0.492 | 73.6 | 73.6 |
| | 2回目 | 19.0 | 52.4 | 0.624 | 47.6 | 86.2 |
| | 3回目 | 29.7 | 41.7 | 0.645 | 55.5 | 93.8 |
| Case2 | 1回目 | 31.3 | 40.2 | 0.499 | 90.7 | 90.7 |
| | 2回目 | 37.7 | 33.7 | 0.549 | 83.7 | 98.5 |
| | 3回目 | 40.6 | 30.9 | 0.565 | 40.1 | 99.1 |
| Case3 | 1回目 | 31.3 | 40.2 | 0.526 | 89.0 | 89.0 |
| | 2回目 | 34.1 | 37.3 | 0.553 | 85.8 | 98.3 |
| | 3回目 | 36.8 | 34.6 | 0.555 | 46.6 | 99.1 |
| Case4 | 1回目 | 31.3 | 40.2 | 0.526 | 89.0 | 89.0 |
| | 2回目 | 34.1 | 37.3 | 0.553 | 85.8 | 98.3 |
| | 3回目 | 42.4 | 29.0 | 0.644 | 50.0 | 99.0 |
| Case5 | 1回目 | 31.3 | 40.2 | 0.526 | 89.0 | 89.0 |
| | 2回目 | 40.1 | 31.4 | 0.595 | 88.1 | 98.6 |
| | 3回目 | 40.7 | 30.7 | 0.593 | 45.3 | 99.1 |
| Case6 | 1回目 | 31.3 | 40.2 | 0.526 | 89.0 | 89.0 |
| | 2回目 | 40.1 | 31.4 | 0.595 | 88.1 | 98.6 |
| | 3回目 | 45.8 | 25.7 | 0.663 | 40.7 | 99.0 |

(実施例 8)

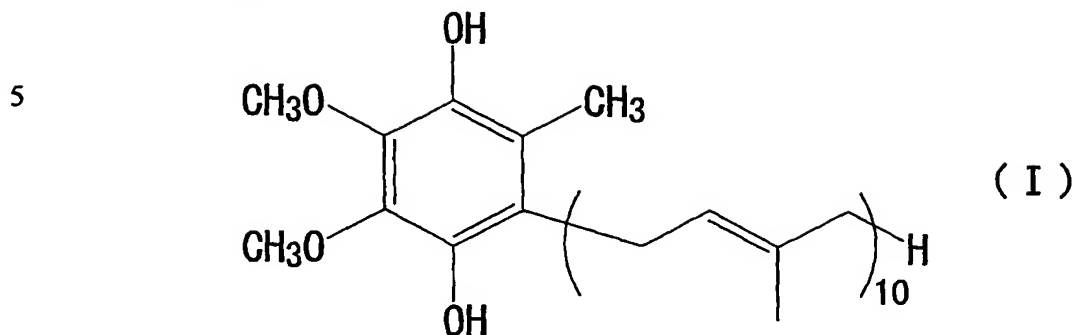
- サイトエラ・コンブリカタ (*Saitoella complicata*) IFO 10748 を培地 (ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、マルトエキス 3 g、グルコース 20 g/L、pH 6.0) で 25℃、72 時間好氣的に 750 L 培養した。得られた菌体を、窒素ガスで密閉したラニー社製圧力式ホモジナイザーにより破砕圧力 140 MPa で 2 回破砕し、菌体破砕液を調製した。この菌体破砕液を、図 1 に示す向流 3 段連続抽出装置にて連続抽出を行った。攪拌槽の容量は 630 L、静置分離槽の容量は 200 L とした。微生物菌体破砕液を第 1 段攪拌槽へ、イソプロパノールと n-ヘキサンを各段へ供給した。菌体破砕液の供給液量は 2 L/分、イソプロパノール及び n-ヘキサンの供給量は、各段への供給量を合計した総量として、イソプロパノール 1.3 L/分、n-ヘキサン 3.7 L/分とした。ただし、この際、各段の溶剤濃度は、イソプロパノール濃度 5~50 v/v%、n-ヘキサン濃度 25~65 v/v% の範囲となるように適宜調整した。抽出は温度 40℃ で、処理時間は 6 時間とした。6 時間目の時点での、3 段目の静置分離槽の抽出残渣中に残る還元型補酵素 Q₁₀ の量より、菌体破砕液から抽出された還元型補酵素 Q₁₀ の回収率を計算したところ、98.9% となった。また、全運転期間を通じ、静置分離は良好に行われ、安定した抽出の連続操作が可能であった。

産業上の利用可能性

- 20 本発明の方法によれば、微生物の培養、還元型補酵素 Q₁₀ の回収という非常に簡便な操作によって、還元型補酵素 Q₁₀ を工業的規模で安価に製造することができ、また、酸化型補酵素 Q₁₀ についても、簡便な操作により製造することができる。

請求の範囲

1. 下記式 (I) ;



10 で表される還元型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出することを特徴とする還元型補酵素 Q_{10} の
15 製造方法。

2. 還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する抽出液を得る請求の範囲第1項記載の製造方法。

20 3. 培養終了時の還元型補酵素 Q_{10} 生産量が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上である請求の範囲第1項又は2項記載の製造方法。

4. 培養は、 $15 \sim 45^\circ\text{C}$ 、且つ、 $\text{pH} 4 \sim 9$ で行われる請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の製造方法。

25

5. 培養中、炭素源の濃度を、還元型補酵素 Q_{10} の生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度に制御する請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の製造方法。

6. 培養は、流加培養法により行われる請求の範囲第5項記載の製造方法。

7. 炭素源を他の成分とは別に培地に供給する請求の範囲第6項記載の製造方法。

5

8. 培養は、好氣的に行われる請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の製造方法。

9. 抽出に際して、微生物細胞を破碎する請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の製造方法。

10

10. 細胞の破碎は、物理的处理、化学的处理、酵素的处理、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、又は、原形質溶解により行われる請求の範囲第9項記載の製造方法。

15

11. 細胞の破碎は、物理的处理、強酸を用いる酸処理、又は、加熱処理により行われる請求の範囲第9項記載の製造方法。

12. 細胞の破碎は、物理的处理により行われる請求の範囲第9項記載の製造方法。

20

13. 物理的处理は、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレス又はボールミルにより行われる請求の範囲第12項記載の製造方法。

14. 細胞の破碎は、酸性～弱塩基性条件下に行われる請求の範囲第9～13項のいずれかに記載の製造方法。

25

15. 還元型補酵素 Q_{10} の抽出に用いる有機溶剤として、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類及びニトリル類のうちの少なくとも一種を用いる請求

の範囲第1～14項のいずれかに記載の製造方法。

16. 還元型補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞又は該細胞破砕物の湿菌体又は乾燥菌体から、親水性有機溶剤を用いて行われる請求の範囲第1～14項のいずれかに記載の製造方法。

17. 親水性有機溶剤は、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノール又は2-プロパノールである請求の範囲第16項記載の製造方法。

10

18. 還元型補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞又は該細胞破砕物の水性懸濁液から、疎水性有機溶剤を用いて行われる請求の範囲第1～15項のいずれかに記載の製造方法。

19. 疎水性有機溶剤は、炭化水素類、脂肪酸エステル類又はエーテル類である請求の範囲第18項記載の製造方法。

20. 疎水性有機溶剤に加えて、補助的溶剤として親水性有機溶剤を併用する請求の範囲第18項又は19項記載の製造方法。

20

21. 疎水性有機溶剤は、炭化水素類であり、親水性有機溶剤は、アルコール類である請求の範囲第20項記載の製造方法。

22. 疎水性有機溶剤は、脂肪族炭化水素であり、親水性有機溶剤は、炭素数1～5の1価アルコールである請求の範囲第20項記載の製造方法。

25

23. 疎水性有機溶剤は、ヘキサン及びヘプタンの少なくとも一種であり、親水性有機溶剤は、メタノール、エタノール、1-プロパノール及び2-プロパノールの少なくとも一種である請求の範囲第20項記載の製造方法。

24. 抽出は、疎水性有機溶剤が25～65容量%及び親水性有機溶剤5～50容量%の条件で行われる請求の範囲第20～23項のいずれかに記載の製造方法。

5

25. 抽出は、連続抽出により行われる請求の範囲第18～24項のいずれかに記載の製造方法。

26. 抽出は、酸性～弱塩基性条件下に行われる請求の範囲第1～25項のいずれかに記載の製造方法。

10

27. 細胞の破碎及び／又は抽出は、還元型補酵素 Q_{10} が酸化反応から防護された条件下に行われる請求の範囲第1～26項のいずれかに記載の製造方法。

28. 酸化反応から防護された条件下は、脱酸素雰囲気下、高塩濃度下、強酸存在下、酸化防止剤存在下、又は、還元条件下である請求の範囲第27項記載の製造方法。

15

29. 還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、試験管（内径21mm、全長200mm）を用いて、10mLの培地〔（グルコース20g、ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g）／L、pH6.0〕中で25℃、72時間振とう培養（振幅2cm、310往復／分）し、得られた増殖液を必要に応じ濃縮し、窒素雰囲気下、該増殖液10容量部に対してイソプロパノール3容量部及びn-ヘキサン18.5容量部の共存下に、ガラスビーズ（425～600ミクロン）を用いて、3分間激しく振とうして破碎することにより調製した疎水性有機溶剤相（n-ヘキサン相）についてHPLCにより測定した場合に、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有するものである請求の範囲第1～28項のいずれかに記載の製造方法。

20

25

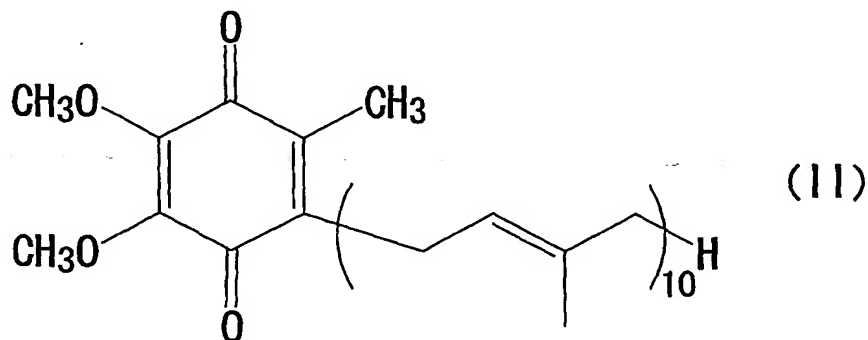
30. 還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、請求の範囲第29項に記載の条件でHPLCにより測定した場合に、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力として $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上を示すものである請求の範囲第29項記載の製造方法。

- 5 31. 微生物が、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アミノバクター (*Aminobacter*) 属、アグロモナス (*Agromonas*) 属、アシドフィラス (*Acidiphilium*) 属、ブレコミセス (*Bulleromyces*) 属、ブレラ (*Bullera*) 属、ブレブンジモナス (*Brevundimonas*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、キオノスファエラ (*Chionosphaera*) 属、カンジタ (*Candida*) 属、セリノステルス (*Cerinosterus*) 属、エキソフィアラ (*Exisophiala*) 属、エキソバシジウム (*Exobasidium*) 属、フィロミセス (*Fellomyces*) 属、フィロバシジエラ (*Filobasidiella*) 属、フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属、ゲオトリカム (*Geotrichum*) 属、グラフィオラ (*Graphi*
10 *ola*) 属、グルコノバクター (*Gluconobacter*) 属、コッコバエラ (*Kockovaella*)
15 属、クルツマノミセス (*Kurtzmanomyces*) 属、ララリア (*Lalaria*) 属、ロイコス
ポリジウム (*Leucosporidium*) 属、レギオネラ (*Legionella*) 属、メチロバクテリ
ウム (*Methylobacterium*) 属、ミコプラナ (*Mycoplasma*) 属、オースポリジウム (*Oosporidium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュドジマ (*Pseudozyma*)
20 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、ペトロミセス (*Petromyc*) 属、ロドトル
ラ (*Rhodotorula*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodosporidium*) 属、リゾモナス (*Rhizomonas*) 属、ロドビウム (*Rhodobium*) 属、ロドプラネス (*Rhodoplane*) 属、
ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、
スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属、スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属、
サイトエラ (*Saitoella*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、ス
25 フィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属、スポトリクム (*Sporotrichum*) 属、シンポ
ジオミコプシス (*Sympodiomyces*) 属、ステリグマトスポリジウム (*Sterigmatosporidium*) 属、タファリナ (*Tapharina*) 属、トレメラ (*Tremella*) 属、トリコ
スポロン (*Trichosporon*) 属、チレチアリア (*Tilletiaria*) 属、チレチア (*Tilletia*) 属、トリポスポリウム (*Tolyposporium*) 属、チレチオプシス (*Tilletiopsis*) 属、

ウスチラゴ (Ustilago) 属、ウデニオミセス (Udeniomyce) 属、キサントフィロミセス (Xanthophyllomyces) 属、キサントバクテリウム (Xanthobacter) 属、ペキロマイセス (Paecilomyces) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属、ハイホモナス (Hyhomonus) 属、又は、リゾビウム (Rhizobium) 属の微生物である請求の
5 範囲第 1 ～ 30 項のいずれかに記載の製造方法。

32. 得られた還元型補酵素Q₁₀を、所望により精製した後、晶析を行って、還元型補酵素Q₁₀結晶を得る請求の範囲第1～31項のいずれかに記載の製造方法。

33. 下記式 (II) ;



で表される酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換した後にこれを有機溶剤で抽出するか、或いは、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出し、必要により精製処理を施した後に、還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換することを特徴とする酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法。

34. 培養終了時の還元型補酵素Q₁₀生産量が1 μg/mL以上である請求の範囲第33項記載の製造方法。

35. 培養は、15～45℃、且つ、pH4～9で行われる請求の範囲第33項又は34項に記載の製造方法。

36. 培養中、炭素源の濃度を還元型補酵素 Q_{10} の生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度に制御する請求の範囲第33～35項のいずれかに記載の製造方法。

37. 培養は、流加培養法により行われる請求の範囲第36項記載の製造方法。

38. 炭素源を他の成分とは別に培地に供給する請求の範囲第37項記載の製造方法。

39. 培養は、好氣的に行われる請求の範囲第33～38項のいずれかに記載の製造方法。

40. 抽出に際して、微生物細胞を破碎する請求の範囲第33～39項のいずれかに記載の製造方法。

41. 細胞の破碎は、物理的处理、化学的处理、酵素的处理、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、又は、原形質溶解により行われる請求の範囲第40項記載の製造方法。

42. 細胞の破碎は、物理的处理により行われる請求の範囲第41項記載の製造方法。

43. 物理的处理は、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレス又はボールミルにより行われる請求の範囲第42項記載の製造方法。

44. 補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞又は該細胞破碎物の湿菌体又は乾燥

菌体から、親水性有機溶剤を用いて行われる請求の範囲第 3 3 ～ 4 3 項のいずれかに記載の製造方法。

4 5. 親水性有機溶剤は、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノール又は2-プロパノールである請求の範囲第 4 4 項記載の製造方法。

4 6. 補酵素 Q₁₀の抽出は、微生物細胞又は該細胞破碎物の水性懸濁液から、疎水性有機溶剤を用いて行われる請求の範囲第 3 3 ～ 4 3 項のいずれかに記載の製造方法。

4 7. 疎水性有機溶剤は、炭化水素類、脂肪酸エステル類又はエーテル類である請求の範囲第 4 6 項記載の製造方法。

4 8. 疎水性有機溶剤に加えて、補助的溶剤として親水性有機溶剤を併用する請求の範囲第 4 6 項又は 4 7 項記載の製造方法。

4 9. 疎水性有機溶剤は、炭化水素類であり、親水性有機溶剤は、アルコール類である請求の範囲第 4 8 項記載の製造方法。

5 0. 疎水性有機溶剤は、脂肪族炭化水素であり、親水性有機溶剤は、炭素数 1 ～ 5 の 1 価アルコールである請求の範囲第 4 8 項記載の製造方法。

5 1. 疎水性有機溶剤は、ヘキサン及びヘプタンの少なくとも一種であり、親水性有機溶剤は、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールの少なくとも一種である請求の範囲第 4 8 項記載の製造方法。

5 2. 抽出は、疎水性有機溶剤が 2 5 ～ 6 5 容量%及び親水性有機溶剤 5 ～ 5 0 容量%の条件で行われる請求の範囲第 4 8 ～ 5 1 項のいずれかに記載の製造方

法。

53. 抽出は、連続抽出により行われる請求の範囲第46～52項のいずれかに記載の製造方法。

5

54. 還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、試験管（内径21mm、全長200mm）を用いて、10mLの培地〔（グルコース20g、ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g）/L、pH6.0〕中で25℃、72時間振とう培養（振幅2cm、310往復/分）し、得られた増殖液を必要に応じ濃縮し、
10 窒素雰囲気下、該増殖液10容量部に対してイソプロパノール3容量部及びn-ヘキサン18.5容量部の共存下に、ガラスビーズ（425～600ミクロン）10容量部を用いて、3分間激しく振とうして破碎することにより調製した疎水性有機溶剤相（n-ヘキサン相）についてHPLCにより測定した場合に、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有するものであ
15 る請求の範囲第33～53項のいずれかに記載の製造方法。

55. 還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、請求の範囲第54項に記載の条件でHPLCにより測定した場合に、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力として1 μ g/mL以上を示すものである請求の範囲第54項記載の製造方法。

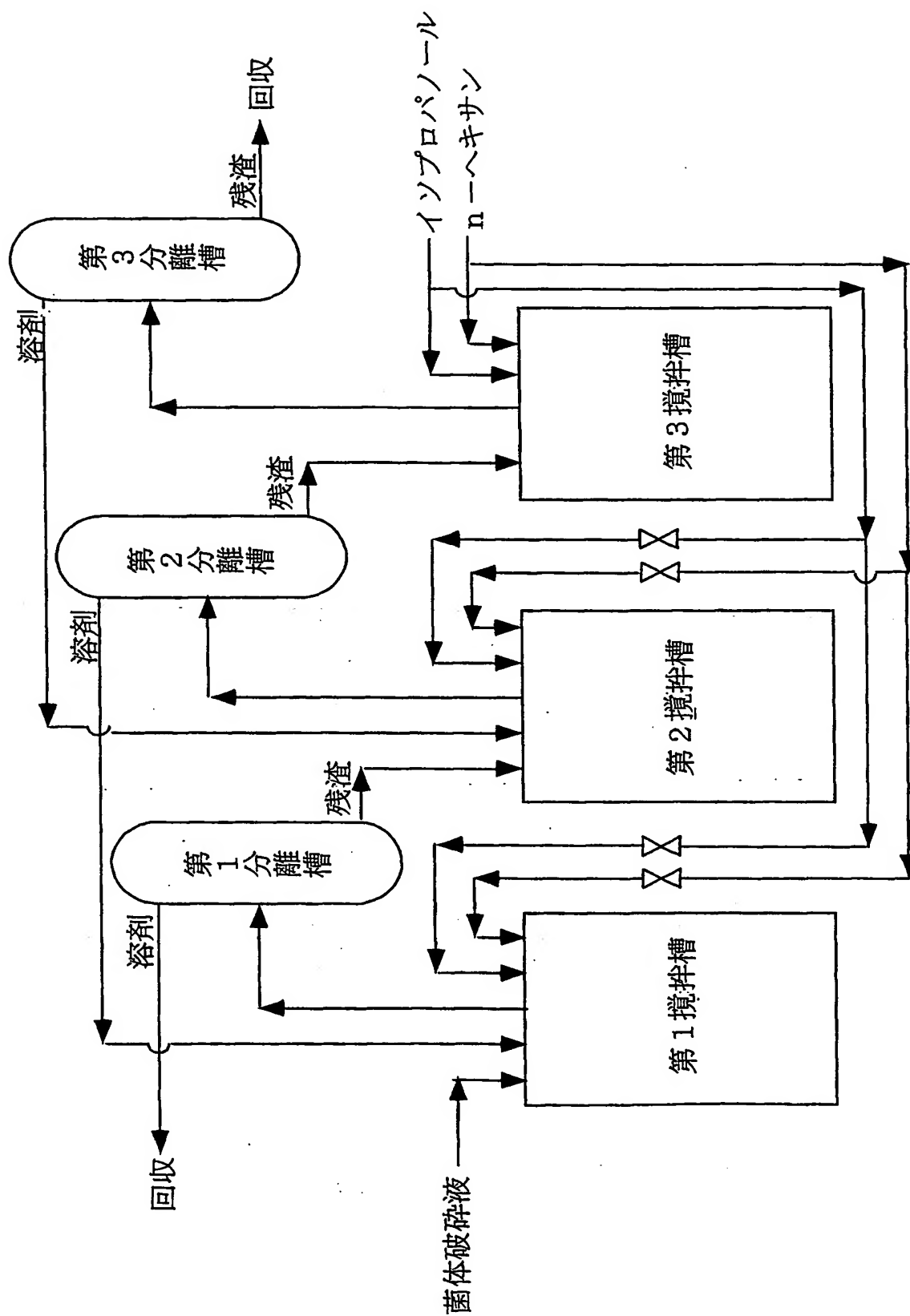
20

56. 微生物が、アグロバクテリウム（*Agrobacterium*）属、アスペルギルス（*Aspergillus*）属、アセトバクター（*Acetobacter*）属、アミノバクター（*Aminobacter*）属、アグロモナス（*Agromonas*）属、アシドフィラス（*Acidiphilium*）属、ブレロミセス（*Bulleromyces*）属、ブレラ（*Bullera*）属、ブレブンジモナス（*Brevundimonas*）属、クリプトコッカス（*Cryptococcus*）属、キオノスファエラ（*Chionosphaera*）属、カンジタ（*Candida*）属、セリノステルス（*Cerinosterus*）属、エキソフィアラ（*Exisophiala*）属、エキソバシジウム（*Exobasidium*）属、フィロミセス（*Fellomyces*）属、フィロバシジエラ（*Filobasidiella*）属、フィロバシジウム（*Filobasidium*）属、ゲオトリカム（*Geotrichum*）属、グラフィオラ（*Graphi*

- ola) 属、グルコノバクター (Gluconobacter) 属、コッコバエラ (Kockovaella) 属、クルツマノミセス (Kurtzmanomyces) 属、ララリア (Lalaria) 属、ロイコス
ポリジウム (Leucosporidium) 属、レギオネラ (Legionella) 属、メチロバクテリ
ウム (Methylobacterium) 属、ミコプラナ (Mycoplasma) 属、オースポリジウム (
- 5 Oosporidium) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、シュドジマ (Pseudozyma)
属、パラコッカス (Paracoccus) 属、ペトロミセス (Petromyces) 属、ロドトル
ラ (Rhodotorula) 属、ロドスポリジウム (Rhodosporidium) 属、リゾモナス (Rh
izomonas) 属、ロドビウム (Rhodobium) 属、ロドプラネス (Rhodoplanes) 属、
ロドシュードモナス (Rhodopseudomonas) 属、ロドバクター (Rhodobacter) 属、
- 10 スポロボロミセス (Sporobolomyces) 属、スポリジオボラス (Sporidiobolus) 属、
サイトエラ (Saitoella) 属、シゾサッカロミセス (Schizosaccharomyces) 属、ス
フィンゴモナス (Sphingomonas) 属、スポトリクム (Sporotrichum) 属、シンポ
ジオミコプシス (Sympodiomyces) 属、ステリグマトスポリジウム (Sterigmat
osporidium) 属、タファリナ (Tapharina) 属、トレメラ (Tremella) 属、トリコ
- 15 スポロン (Trichosporon) 属、チレチアリア (Tilletiaria) 属、チレチア (Tilletia)
属、トリポスポリウム (Tolyposporium) 属、チレチオプシス (Tilletiopsis) 属、
ウスチラゴ (Ustilago) 属、ウデニオミセス (Udeniomyces) 属、キサントフィロ
ミセス (Xanthophyllomyces) 属、キサントバクテリウム (Xanthobacter) 属、ペキ
ロマイセス (Paecilomyces) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属、ハイホモナ
- 20 ス (Hyphomycetes) 属、又は、リゾビウム (Rhizobium) 属の微生物である請求の
範囲第 33～55 項のいずれかに記載の製造方法。

57. 得られた酸化型補酵素 Q_{10} を、所望により精製した後、晶析を行って、
酸化型補酵素 Q_{10} 結晶を得る請求の範囲第 33～56 項のいずれかに記載の製
- 25 造方法。

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP02/13766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P7/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P7/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| E, X | WO 02/052017 A1 (Kaneka Corp.), 04 July, 2002 (04.07.02), Background arts; page 4, line 10 to page 5, line 3; examples 1 to 11 & JP 2002-191367 A | 1-57 |
| E, X | WO 02/088365 A1 (Kaneka Corp.), 07 November, 2002 (07.11.02), Background arts; page 3, line 27 to page 4, line 19; examples 1 to 7 & JP 2002-345469 A | 1-57 |
| E, X | WO 02/40682 A1 (Kaneka Corp.), 23 May, 2002 (23.05.02), Background arts; page 4, line 26 to page 5, line 25 (Family: none) | 1-57 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 April, 2003 (01.04.03)

Date of mailing of the international search report
15 April, 2003 (15.04.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

P JP02/13766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | EP 1123979 A1 (Kaneka Corp.), 16 August, 2001 (16.08.01), Par. Nos. [0002] to [0033]; examples 1 to 8 & WO 01/14567 A1 & JP 2001-061478 A & AU 2000067270 A & NO 2001001995 A | 1-57 |
| X | US 3769170 A (Ajinomoto Kabushiki Kaisha), 30 October, 1973 (30.10.73), Claims; table 1 & JP 48-25517 B & GB 1343066 A | 1-57 |
| X | JP 54-119090 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 14 September, 1979 (14.09.79), Claims; page 2, lower left column, line 1 to lower right column, line 10; tables 1 to 2 (Family: none) | 1-57 |
| X | JP 54-110388 A (Kanegafuchi Chem. Kabushiki Kaisha), 29 August, 1979 (29.08.79), Claims; examples 1 to 2 (Family: none) | 1-57 |
| X | JP 55-68295 A (Godo Shusei Co., Ltd.), 22 May, 1980 (22.05.80), Claims; examples 1 to 5 (Family: none) | 1-57 |
| X | JP 55-21756 A (AIDA, H.), 16 February, 1980 (16.02.80), Claims; examples 1 to 6 (Family: none) | 1-57 |
| X | JP 55-28 A (AIDA, H.), 05 January, 1980 (05.01.80), Claims; examples 1 to 2 (Family: none) | 1-57 |
| X | WAKAO, N. et al., " Acidiphilium multivorum sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage", Journal of General and Applied Microbiology, (1994), Vol.40, No.2, pages 143 to 159, particularly, abstract | 1-57 |
| X | OHTA, H., "Agromonas Oligotrophica gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium", Antonie Van Leeuwenhoek, (1983), Vol.49, Nos.4 to 5, pages 429 to 446, particularly, abstract | 1-57 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

T/JP02/13766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | YABUUCHI, E. et al., "Proposals of <i>Sphingomonas paucimobilis</i> gen. nov. and comb. nov., <i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> sp. nov., <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> sp. nov., <i>Sphingomonas adhaesiva</i> sp. nov., <i>Sphingomonas capsulata</i> comb. nov., and two genospecies of the genus <i>Sphingomonas</i> ", <i>Microbiology and Immunology</i> , (1990), Vol.34, No.2, pages 99 to 119, particularly, abstract | 1-57 |
| X | Transfer of <i>Pseudomonas-aminovorans</i> den Dooren de Jong 1926 to <i>Aminobacter</i> gen. nov. as <i>Aminobacter aminovorans</i> comb. nov. and description of <i>Aminobacter aganoensis</i> sp. nov. and <i>Aminobacter niigataensis</i> sp. nov.", <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , (1992), Vol.42, No.1, pages 84 to 92, particularly, abstract | 1-57 |
| Y | URAKAMI, T. et al., "Production of ubiquinone and bacteriochlorophyll alpha by <i>Rhodobacter sphaeroides</i> and <i>Rhodobacter sulfidophilus</i> ", <i>Journal of Fermentation and Bioengineering</i> , (1993), Vol.76, No.3, pages 191 to 194, particularly, abstract | 1-57 |
| Y | URAKAMI, T., et al., "Production of isoprenoid compounds in the facultative methylotroph <i>Protomonas extroquens</i> ", <i>J. Ferment. Technol.</i> , (1988), Vol.66, No.3, pages 323 to 332, particularly, abstract; table 2 | 1-57 |
| Y | YAMADA, Y. et al., "The coenzyme Q system in strains of <i>Trichosporon</i> species and related organisms", <i>Journal of General and Applied Microbiology</i> , (1982), Vol.28, No.4, pages 355 to 358, particularly, abstract | 1-57 |
| Y | SAKATO, K. et al., "Agitation-aeration studies on coenzyme Q-10 production using <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> ", <i>Biotechnol. Appl. Biochem.</i> , (1992), Vol.16, No.1, pages 19 to 28, particularly, abstract | 1-57 |
| Y | NATORI, Y. et al., "Studies on metabolites produced by facultative methanol-oxidizing bacteria. Part V. Enhancement of coenzyme Q10 accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of coenzyme Q homologs by <i>Pseudomonas</i> N842 and mutants", <i>Agric. Biol. Chem.</i> , (1981), Vol.45, No.10, pages 2175 to 2182, particularly, abstract | 1-57 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/13766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | NATORI, Y. et al., "Studies on the metabolites produced by facultative methanol oxidizing bacteria. Part I. Production of coenzyme Q10 by Pseudomonas N842", Agric.Biol.Chem., (1978), Vol.42, No.9, pages 1799 to 1800; particularly, abstract | 1-57 |
| Y | YOSHIDA, H. et al., "Production of ubiquinone-10 using bacteria", Journal of General and Applied Microbiology, (1998), Vol.44, No.1, pages 19 to 26, particularly, abstract | 1-57 |
| Y | Kochova-Kratochvilova, A. et al., "Die beziehungen innerhalb der gattung cryptococcus (sanfelice) vuillemin", ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE, PARASITENKUNDE, INFektionsKRANKHEITEN UND HYGIENE. ZWEITE NATURWISSENSCHAFTLICHE ABT.: ALLGEMEINE, LANDWIRTSCHAFTLICHE UND TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE, (1976), Vol.131, No.7, pp.610-31(abstract) Medline [online]; retrieved from: STN International. Medline accession No.77107492. | 1-57 |
| Y | DD 236552 A1 (Akademie der Wissenschaften der DDR), 06 November, 1986 (06.11.86), Beispiels 1 to 3 (Family: none) | 1-57 |
| Y | JP 57-33599 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 23 February, 1982 (23.02.82), Claims (Family: none) | 1-57 |
| Y | JP 55-27 A (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd.), 05 January, 1980 (05.01.80), Claims (Family: none) | 1-57 |
| Y | US 4220719 A (AIDA, H.), 02 September, 1980 (02.09.80), Claims & JP 54126792 A | 1-57 |
| Y | JP 48-8836 B (Ajinomoto Co., Inc.), 17 March, 1973 (17.03.73), Table 1; Claims (Family: none) | 1-57 |
| Y | JP 56-154994 A (Sekisui Chem. Ind. Co., Ltd.), 30 November, 1981 (30.11.81), Examples 1 to 3 (Family: none) | 1-57 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

/JP02/13766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 56-154996 A (Sekisui Chem. Ind. Co., Ltd.), 30 November, 1981 (30.11.81), Examples 1 to 5 (Family: none) | 1-57 |
| Y | JP 56-55196 A (Mitsubishi Gas Chem. Ind. Co., Ltd.), 15 May, 1981 (15.05.81), Examples 1 to 9 (Family: none) | 1-57 |
| Y | JP 55-148084 A (Mitsubishi Gas Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 November, 1980 (18.11.80), Examples 1 to 3 (Family: none) | 1-57 |
| Y | JP 10-57072 A (Alpha Shokuhin Kabushiki Kaisha), 03 March, 1998 (03.03.98), Particularly, Par. Nos. [0006] to [0010] (Family: none) | 1-57 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13766

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The requirement of unity of invention in an international application (PCT Rule 13.1) shall be fulfilled only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). The determination of the requirement of unity of invention shall be made without regard to whether the inventions are claimed in separate claims or as alternatives within a single claim (PCT Rule 13.3).

Production of coenzyme Q₁₀ with the use of microorganisms (for example, those having the deposition numbers IFO 10748 and ATCC 10567 as cited in the detailed description of the invention) capable of producing coenzyme Q₁₀ and containing reduced coenzyme Q₁₀ in an amount of at least 70% by mol based on the total coenzymes Q₁₀ had been publicly known as reported by EP 1 123979 A1 or US 3769170 A.

Therefore, use of a microorganism containing reduced coenzyme Q₁₀ in an amount of at least 70% by mol based on the total coenzymes Q₁₀ cannot be regarded as a special technical feature of the present invention.

Such being the case, it is recognized that the present application has 63 inventions having technical features of using 63 microorganisms as set forth in claim 31 respectively.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P7/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C12P7/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| EX | WO 02/052017 A1 (Kaneka Corp.), 2002.07.04 背景技術, 第4頁第10行-第5頁第3行及び実施例1-11参照 & JP 2002-191367 A | 1-57 |
| EX | WO 02/088365 A1 (Kaneka Corp.), 2002.11.07 背景技術, 第3頁第27行-第4頁第19行及び実施例1-7参照 & JP 2002-345469 A | 1-57 |
| EX | WO 02/40682 A1 (Kaneka Corp.), 2002.05.23 背景技術及び第4頁第26行-第5頁第25行参照 (ファミリーなし) | 1-57 |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.04.03

国際調査報告の発送日

15.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4 B

9 6 3 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | EP 1123979 A1 (Kaneka Corp.), 2001.08.16 段落0002-0033, 実施例1-8参照 & WO 01/14567 A1 & JP 2001-061478 A & AU 2000067270 A & NO 2001001995 A | 1-57 |
| X | US 3769170 A (Ajinomoto KK), 1973.10.30 特に請求の範囲及び表1参照 & JP 48-25517 B & GB 1343066 A | 1-57 |
| X | JP 54-119090 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 1979.09.14 請求の範囲及び第2頁左下欄第1行-右下欄第10行及び第1-2表参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| X | JP 54-110388 A (Kanegafuchi Chem. KK), 1979.08.29 請求の範囲及び実施例1-2参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| X | JP 55-68295 A (Godo Shusei Co., Ltd.), 1980.05.22 請求の範囲及び実施例1-5参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| X | JP 55-21756 A (Aida, H.), 1980.02.16 請求の範囲及び実施例1-6参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| X | JP 55-28 A (Aida, H.), 1980.01.05 請求の範囲及び実施例1-2参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| X | Wakao, N. et al., "Acidiphilium multivorum sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage" Journal of General and Applied Microbiology, (1994), Vol. 40, No. 2, pp. 143-159, 特に要約参照 | 1-57 |
| X | Ohta, H., "Agromonas oligotrophica gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium" Antonie Van Leeuwenhoek, (1983), Vol. 49, No. 4-5, pp. 429-446, 特に要約参照 | 1-57 |
| X | Yabuuchi, E., et al., "Proposals of Sphingomonas paucimobilis gen. nov. and comb. nov., Sphingomonas parapaucimobilis sp. nov., Sphingomonas yanoikuyae sp. nov., Sphingomonas adhaesiva sp. nov., Sphingomonas capsulata comb. nov., and two genospecies of the genus Sphingomonas" Microbiology and Immunology, (1990), Vol. 34, No. 2, pp. 99-119, 特に要約参照 | 1-57 |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X | Transfer of <i>Pseudomonas</i> -aminovorans den Dooren de Jong 1926 to <i>Aminobacter</i> gen. nov. as <i>Aminobacter aminovorans</i> comb. no v. and description of <i>Aminobacter aganoensis</i> sp. nov. and <i>Aminobacter niigataensis</i> sp. nov." Int. J. Syst. Bacteriol., (1992), Vol.42, No.1, pp.84-92, 特に要約参照 | 1-57 |
| Y | Urakami, T., et al., "Production of ubiquinone and bacteriochlorophyll alpha by <i>Rhodobacter sphaeroides</i> and <i>Rhodobacter sulfidophilus</i> " Journal of Fermentation and Bioengineering, (1993), Vol.76, No.3, pp.191-194, 特に要約参照 | 1-57 |
| Y | Urakami, T., et al., "Production of isoprenoid compounds in the facultative methylotroph <i>Protomonas extroquens</i> " J. Ferment. Technol., (1988), Vol.66, No.3, pp.323-332, 特に要約及び表2参照 | 1-57 |
| Y | Yamada, Y., et al., "The coenzyme Q system in strains of <i>Trichosporon</i> species and related organisms" Journal of General and Applied Microbiology, (1982), Vol.28, No.4, pp.355-358, 特に要約参照 | 1-57 |
| Y | Sakato, K., et al., "Agitation-aeration studies on coenzyme Q-10 production using <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> , Biotechnol. Appl. Biochem., (1992), Vol.16, No.1, pp.19-28, 特に要約参照 | 1-57 |
| Y | Natori, Y., et al., "Studies on metabolites produced by facultative methanol-oxidizing bacteria. Part V. Enhancement of coenzyme Q10 accumulation by mutation and effects of medium components on the formation of coenzyme Q homologs by <i>Pseudomonas</i> N842 and mutants" Agric. Biol. Chem., (1981), Vol.45, No.10, pp.2175-2182, 特に要約参照 | 1-57 |
| Y | Natori, Y., et al., "Studies on the metabolites produced by facultative methanol oxidizing bacteria. Part I. Production of coenzyme Q10 by <i>Pseudomonas</i> N842" Agric. Biol. Chem., (1978), Vol.42, No.9, pp.1799-1800, 特に要約参照 | 1-57 |
| Y | Yoshida, H., et al., "Production of ubiquinone-10 using bacteria" Journal of General and Applied Microbiology, (1998), Vol.44, No.1, pp.19-26, 特に要約参照 | 1-57 |

C (続き). 関連すると認められる

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | Kochova-Kratochvilova, A., et al., "Die beziehungen innerhalb der gattung cryptococcus (sanfelice) vuillemin" ZENTRALBLATT FUR BAKTERIOLOGIE, PARASITENKUNDE, INFektionsKRANKHEITEN UND HYGIENE. ZWEITE NATURWISSENSCHAFTLICHE ABT.: ALLGEMEINE, LANDWIRTSCHAFTLICHE UND TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE, (1976), Vol.131, No.7, pp.610-31 (abstract) Medline [online]; retrieved from: STN International. Medline accession no.7710 7492 | 1-57 |
| Y | DD 236552 A1 (Akademie der Wissenschaften der DDR), 1986.11.06, Beispiel 1-3参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 57-33599 A (Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.), 1982.02.23, 請求の範囲参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 55-27 A (Kanegafuchi Chemical Industry Co., Ltd.), 1980.01.05, 請求の範囲参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | US 4220719 A (Aida, H.) 1980.09.02, 請求の範囲参照 & JP 54126792 A | 1-57 |
| Y | JP 48-8836 B (Ajinomoto Co., Inc.), 1973.03.17, 第1表及び請求の範囲参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 56-154994 A (Sekisui Chem. Ind. Co., Ltd.), 1981.11.30, 実施例1-3参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 56-154996 A (Sekisui Chem. Ind. Co., Ltd.), 1981.11.30, 実施例1-5参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 56-55196 A (Mitsubishi Gas Chem. Ind. Co., Ltd.), 1981.05.15, 実施例1-9参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 55-148084 A (Mitsubishi Gas Chem. Ind. Co., Ltd.), 1980.11.18, 実施例1-3参照 (ファミリーなし) | 1-57 |
| Y | JP 10-57072 A (Alpha Shokuhin KK), 1998.03.03, 特に段落0006-0010参照 (ファミリーなし) | 1-57 |

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(別紙参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

国際出願における発明の単一性の要件（PCT規則13.1）は、請求の範囲に記載された一群の発明の間に一又は二以上の同一または対応する特別な技術的特徴を含む技術的關係があるときに限り、満たされるものであって、この「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである（PCT規則13.2）。また、発明の単一性の要件の判断は、一群の発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に括一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われる（PCT規則13.3）。

ここで、補酵素Q10を生産する微生物であって、還元型補酵素Q10を全補酵素Q10のうち70モル%以上の比率で含有する微生物として発明の詳細な説明に挙げられている、寄託番号IFO 10748, ATCC 10567等の微生物を用いて、補酵素Q10を生産することは、EP 1 123 979 A1、あるいはUS 3 769 170 Aにも記載されるとおり公知である。

したがって、還元型補酵素Q10を全補酵素Q10のうち70モル%以上の比率で含有する微生物の使用を本願発明の特別な技術的特徴とすることはできない。

これにより、本願には、請求の範囲31に記載される63の属の微生物をそれぞれ使用することを技術的特徴とする、63個の発明が存在しているものと認められる。